TERPENOIDE AUS DEN LAUBBLÄTTERN VON TECTONA GRANDIS L. FIL.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie

vorgelegt von
Ilona Christiansen
aus Hannover

Berlin 1976

TERPENOIDE AUS DEN LAUBBLÄTTERN VON TECTONA GRANDIS L. FIL.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie

vorgelegt von

Ilona Christiansen

aus Hannover

Berlin 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Professor Dr. H. Rimpler
Korreferent: Professor Dr. K. Rehse
Tag der mündlichen Prüfung: 14. DEZ. 1976

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakognosie und Phytochemie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Rimpler durchgeführt.

Ich danke Herrn Professor Dr. H. Rimpler für die Anregung, das vorliegende Thema zu bearbeiten und für die in stetem Interesse am Fortgang der Arbeit gegebenen wertvollen Hinweise und Ratschläge.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die gute Zusammenarbeit, vor allem Frau H. Pistor für die vielen praktischen Ratschläge im Labor.

Herrn W. Bähr danke ich für die Ausführung der Fotoarbeiten.

Für die Aufnahmen der Massenspektren und Gaschromatogramme danke ich Herrn J. Lindemann und Herrn D. Grunow, Pharmazeutisches Institut, und für die Herstellung der NMR-Spektren Fräulein M. Brauer und Fräulein G. Dreke, Institut für Organische Chemie.

Seite

I EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG 8

II LITERATURTEIL

A Zur Morphologie der Verbenaceae unter besonderer Berücksichtigung von Tectona grandis L. fil. 11

B Überblick über Eigenschaften und Inhaltsstoffe von Tectona grandis L. fil. 15

C Diterpene:
Strukturtypen und Biosynthese 22
Vorkommen und taxonomische Bedeutung bei den Lamiales 28

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN - HAUPTTEIL

A Isolierung

Vortrennung und Aufstellung eines Isolierungsschemas 31
Aufarbeitung des hydrophilen Extraktanteils und Isolierung der Verbindungen TG-1 bis TG-3 34
Aufarbeitung des lipophilen Extraktanteils und Isolierung der Verbindungen TG-8 bis TG-4 36

B Identifizierung und Strukturaufklärung

TG-1 - Identifizierung als meso-Inosit 39
TG-2 - Identifizierung als Zuckergemisch 41
TG-3 - Ansätze für eine Strukturaufklärung 42
TG-8 - Identifizierung als Alkangemisch 45

Seite

TG-7 und TG-6 - Identifizierung als Lupenon und Lupeol 48
TG-5 - Identifizierung als Phytosteringemisch 53
TG-4 - Strukturaufklärung und Stereochemie von Tectograndinol 60

IV EIGENE UNTERSUCHUNGEN - EXPERIMENTELLER TEIL

A Allgemeine Angaben

Pflanzenmaterial 76
Chromatographie 76
Spektroskopie 77
Schmelzpunkte, optische Drehung und Elementaranalyse 78

B Spezielle Angaben

Isolierung der Verbindungen TG-1 bis TG-8 79
Eigenschaften von meso-Inosit (TG-1) 83
Eigenschaften des Zuckergemisches (TG-2) 84
Eigenschaften der Verbindung TG-3 85
Acetylierung der Verbindung TG-3 86
Eigenschaften der Verbindung TG-3 Ac 86
Hydrolyse der Verbindung TG-3 87
Eigenschaften des Alkangemisches (TG-8) 88
Eigenschaften von Lupenon (TG-7) 89
Reduktion der Verbindung TG-7 90
Eigenschaften von Lupeol (TG-6) 91
Acetylierung der Verbindung TG-6 92
Eigenschaften der Verbindung TG-6 Ac 92
Oxidation der Verbindung TG-6 93
Eigenschaften des Phytosteringemisches (TG-5) 94

		Seite
	Acetylierung des Gemisches TG-5	95
	Eigenschaften des Gemisches TG-5 Ac	95
	Trimethylsilylierung des Gemisches TG-5	96
	Eigenschaften des Gemisches TG-5 TMS	96
	Eigenschaften von Tectograndinol (TG-4)	97
	Acetylierung der Verbindung TG-4	98
	Eigenschaften der Verbindung TG-4 Ac_2	99
	Eigenschaften der Verbindung TG-4 Ac_3	100
	Umsetzung der Verbindung TG-4 mit Trifluoracetanhydrid	101
	Eigenschaften der Verbindung TG-4 TFAc	101
	Oxidation der Verbindung TG-4 mit Jones Reagenz	102
	Eigenschaften der Verbindung TG-4 Ox I	103
	Deuterierung der Verbindung TG-4 Ox I	104
	Eigenschaften der Verbindung TG-4 Ox I-d_2	104
	Oxidation der Verbindung TG-4 mit Mangan(IV)-oxid	105
	Eigenschaften der Verbindung TG-4 Ox II	106
	Synthese von racem. α-Phenylbuttersäureanhydrid	107
	Eigenschaften der Verbindung α-PBSA	108
	Bestimmung der absoluten Konfiguration von C(3) in TG-4 nach der Horeau-Methode	109
V	DISKUSSION	110
VI	ZUSAMMENFASSUNG	115
VII	LITERATURANGABEN	117
VIII	LEBENSLAUF	121

I EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Mit dem Oberbegriff Terpenoide werden Verbindungen überwiegend pflanzlichen Ursprungs bezeichnet, deren Gemeinsamkeit darin besteht, daß ihr Kohlenstoffgerüst aus zwei bis acht Isoprenbausteinen zusammengesetzt ist. Während diese C_5-Grundbausteine selbst noch nie aus Pflanzen isoliert werden konnten, ist von ihren oft mehrfach cyclisierten und umgelagerten Polymeren ein breites Spektrum von Mono-, Di-, Tri- und Tetraterpenen bekannt, die von sehr primitiven Formen bis zu äußerst komplizierten Strukturen variieren.

Eine Gruppe von Terpenoiden, die zwar ihrer Summenformel nach zu den kleinsten gehören, jedoch aufgrund ihres verhältnismäßig komplexen Biosyntheseweges als hoch entwickelt gelten, stellen die Iridoide dar. Sie liegen als Glykoside, teilweise mit secoiridoidem Aufbau und als Teilstrukturen von Alkaloiden vor und nehmen nach HEGNAUER (1973) und JENSEN, NIELSEN, DAHLGREN (1975) für die Klärung taxonomischer Fragen einen hohen Stellenwert ein. Ihre Verbreitung im Pflanzenreich konzentriert sich nach dem heutigen Wissensstand vorwiegend auf einzelne Ordnungen der beiden Unterklassen Rosidae und Asteridae, die innerhalb der Magnoliatae als stark abgeleitet angesehen werden. Eine dieser iridoidführenden Ordnungen sind die Lamiales, welche für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse sind. Die Natürlichkeit ihrer weitergehenden Unterteilung in Familien, vorzugsweise die strenge Trennung von Lamiaceae (= Labiatae) und Verbenaceae, wie sie von BENTHAM und SCHAUER 1847 eingeführt und seitdem mehr oder weniger unverändert von allen maßgeblichen Taxonomen (BRIQUET 1897, MELCHIOR 1964) übernommen wurde, wird in den letzten Jahren immer wieder angezweifelt. Nach einer numerischen Analyse der morphologisch anatomischen Merkmale von etwa 400

Lamiaceae- und Verbenaceae-Arten stellten EL-GAZZAR und WATSON (1970) die Uneinheitlichkeit der Labiatae fest und schlugen eine neue Abgrenzung zu den Verbenaceae vor. Diese harmoniert recht gut mit einer bereits 1934 von JUNELL aufgrund einer vergleichenden morphologischen Gynäceum Untersuchung aufgestellten Neuordnung. Die Umgruppierung von EL-GAZZAR und WATSON reicht bis in die Unterfamilie Viticoideae hinein, bei der für die Gattungen Premna, Holmskioldia und Gmelina eine größere Ähnlichkeit zu den Labiaten-Unterfamilien Ajugoideae, Prasieae und Melitteae festgestellt wurde als sie zu den übrigen Gattungen der Viticoideae besteht. Zur weiteren Aufklärung der taxonomischen Zusammenhänge wird die Kenntnis der Pflanzeninhaltsstoffe innerhalb dieses Verwandtschaftskreises von Bedeutung sein.

Bei den bisher durchgeführten chemischen Untersuchungen wurde in vielen Arten innerhalb der Viticoideae eine Akkumulation von Iridoiden festgestellt; z.B. enthalten alle untersuchten Arten der Gattungen Vitex (WINDE 1959, HÄNSEL et al. 1960, 1965, RIMPLER 1972, IRION 1975), Holmskioldia (NEUMANN 1976), Caryopteris (RIMPLER nach JENSEN, NIELSEN, DAHLGREN 1975) und einige Arten der Gattungen Clerodendrum (KOOIMAN 1975) und Premna (NEUMANN 1976) Iridoide, während in Callicarpa-Arten bisher keine derartigen Verbindungen nachgewiesen werden konnten.

Eine weitere terpenoide Stoffgruppe bilden die Diterpene, die ebenfalls bei den Viticoideae häufiger vorkommen. Bis heute konnten sie in Vitex- (HIROTSU, SHIMADA 1973), Clerodendrum- (KATO et al. 1971, 1972, 1973, BARTON et al. 1961, PAUL et al. 1962), Caryopteris- (HOSOZAWA et al. 1973, 1974) und Callicarpa-Arten (KAWAZUet al. 1966, 1967, 1971, CHATTERJEE et al. 1972) nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Iridoiden stellen die Diterpene eine weitaus umfangreichere Gruppe mit

viel größerer Verbreitung dar, so daß es auf den ersten Blick nicht möglich erscheint, taxonspezifische Aussagen zu machen. Trotzdem sind Beispiele für bestehende Korrelationen zwischen Pflanzenfamilien und den in ihnen auftretenden Diterpenfamilien gefunden worden, wie sie OURISSON (1973) z.B. für die Pinaceae, Euphorbiaceae und Ericaceae aufgezeigt hat. Es gilt dabei allgemein, daß gerade die besonders ausgefallenen Strukturtypen, welche lange und komplizierte Biosynthesewege durchlaufen haben, in ihrem Auftreten auf einzelne Familien, Gattungen oder sogar Arten beschränkt sind. Weiterreichende Aussagen über die Taxonspezifität von Diterpenen werden sich allerdings erst dann treffen lassen, wenn die bislang noch sehr lückenhaften Kenntnisse über die Verbreitung dieser Verbindungen hinreichend vervollständigt sind.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich nun mit der Isolierung und Identifizierung der hydrophilen und lipophilen Blätterinhaltsstoffe von Tectona grandis L. fil., die zur Unterfamilie Viticoideae zählt, wobei insbesondere das Vorkommen von Iridoiden und Diterpenen untersucht wird. Anhand der Ergebnisse wird die chemotaxonomische Bedeutung dieser Substanzgruppen für den Verwandtschaftskreis der Viticoideae diskutiert.

II LITERATURTEIL

A Zur Morphologie der Verbenaceae unter besonderer Berücksichtigung von Tectona grandis L. fil.

Nach MELCHIOR (1964) umfaßt die Familie der Verbenaceae etwa 100 Gattungen mit insgesamt 2 600 Arten, die zum überwiegenden Teil in den Tropen und Subtropen beheimatet sind. Die meisten Vertreter stellen vom Habitus her Sträucher und Halbsträucher dar, aber auch Bäume und ausdauernde Kräuter sind keine Seltenheit. Die meist einfachen fiedernervigen Blätter sind fast ausnahmslos gegenständig und besitzen keine Nebenblätter. Die zwittrigen Blüten bilden cymöse oder racemöse Infloreszenzen, wobei die tetracyclischen Einzelblüten im allgemeinen 5-zählig sind. Es zeigt sich jedoch eine deutliche Tendenz zur Reduktion der Gliederzahl, aus der die Entwicklung zu den meist zygomorphen Blüten der Familie resultiert. Während der Kelch noch in der Regel polysymmetrisch aus fünf Blättern röhrig oder glockig verwachsen ist - wie aus der Anzahl der mehr oder weniger tief getrennten Zipfel zu entnehmen ist - weist die Blütenkronröhre durch Verwachsung der beiden hinteren Petalen schon häufig eine gewisse Dorsiventralität auf. In den inneren Blütenkreisen findet man dann Pentamerie nur noch in Ausnahmefällen vor. Das Androeceum ist in der Regel auf vier episepale Stamina reduziert, von denen oft zwei zu Staminodien zurückgebildet oder zumindest in Länge und Insertionshöhe den beiden anderen gegenüber zurückgesetzt sind. Der oberständige Fruchtknoten ist gewöhnlich aus nur zwei medianen Karpellen verwachsen mit jeweils zwei Samenanlagen, die vielfach durch Ausbildung einer falschen Scheidewand in der ausgebildeten Frucht voneinander getrennt sind. Der einfache Griffel steht terminal auf dem Ovar. Die Samenanlagen besitzen nur ein Integument und sind in unterschiedlicher Höhe an der Plazenta inseriert. Dabei sind sie stets

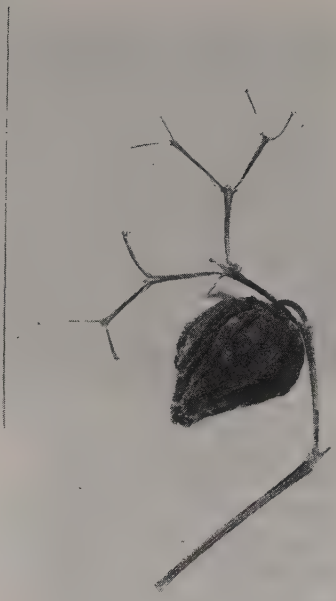
so gekrümmt, daß die Micropyle nach unten gerichtet ist. Es werden fast durchweg Steinfrüchte - nur selten Kapseln - ausgebildet, die in zwei bis vier Teilfrüchte oder aber in bis zu vierteilige Steinkerne zerfallen. Die Nährstoffe für den Embryo werden bei den meisten Gattungen in den dicken Kotyledonen gespeichert, so daß den Samen ein Endosperm fehlt. Ist es ausnahmsweise dennoch entwickelt, besitzt es einen zellulären Aufbau.

Die Gattung Tectona wird von Systematikern einheitlich der Unterfamilie Viticoideae zugeordnet. Die kleine Gattung besteht aus nur drei Arten, die alle im südöstlichen Asien und Malayischen Archipel beheimatet sind. BRIQUET (1897) stellt Tectona grandis L. fil. als Lachnaiocarpae den beiden anderen Arten, Tectona ternifolia Ham. und Tectona philippinensis Benth., gegenüber, die er als Leiocarpae zusammenfaßt. Als Unterscheidungskriterium dient dabei die Ausgestaltung der Früchte: Bei Tectona grandis L. fil. ist das Exocarp von einem dichten Filzmantel bedeckt (Abb.3 u. 4) und von einem zur Reifezeit stark vergrößerten und aufgeblasenen Kelch umgeben (Abb.2 u. 3), während die Früchte der Leiocarpae Briq. durch ein eher kahles Exocarp und einen zwar vergrößerten aber nicht aufgeblasenen Kelch gekennzeichnet sind.

Tectona grandis L. fil. entwickelt sich zu großen, bis zu 50 m hohen Bäumen mit weicher Rinde und sich tetragonal verzweigenden Ästen. Die breiten, an beiden Enden keilförmig zugespitzten und ganzrandigen Blätter (Abb.1) stehen auf kurzen kräftigen Stielen gegenständig oder wirtelig und erreichen eine sehr beachtliche Größe: 11 bis 85 cm in der Länge und 6 bis 50 cm in der Breite. Die cymösen Infloreszenzen mit einem Durchmesser von etwa 50 cm bestehen aus einer Vielzahl von kleinen weißen Blüten, von denen jedoch nur wenige fertil sind. Sie bilden terminale Rispen mit dichasialen Teilblüten-

Herbarexemplar von
Tectona grandis L. fil.

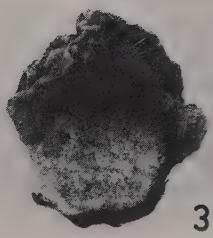
1



2

Abb.1
Laubblätter

Abb.2
Partialinfloreszenz
mit Frucht



3

Abb.3
Frucht, teilweise vom
umgebenden Kelch befreit

4

Abb.4
Frucht, quergeschnitten

ständen (Abb.2). Die Brakteen sind klein und schmal. In den radiären Blüten sind die zu einer kurzen 5- bis 6-spaltigen Röhre verwachsenen Kronblätter von einem ebenfalls 5- bis 6-spaltigen, glockenförmigen, weißlich behaarten Kelch umgeben, der sich - wie oben erwähnt - zur Reifezeit vergrößert und die Frucht ballonartig umgibt (Abb.3). Am Grunde der Blumenkronröhre sind 5 bis 6 völlig gleichartige Staubblätter inseriert mit jeweils zwei länglichen parallelen Theken. Sie bilden Pollenkörner aus, die durch eine fast glatte Exine charakterisiert sind. Der aus zwei Karpellen mit je zwei seitenständigen Samenanlagen gebildete Fruchtknoten beginnt sich bereits in der Anlage zu fächern. Er entwickelt sich zu einer im Durchmesser etwa 2 cm großen 4-kernigen Steinfrucht, deren dickes knochiges Endocarp in vier Kammern geteilt und von einem etwas fleischigen, dicht behaarten Exocarp umgeben ist (Abb.4). Die Samen enthalten kein Nährgewebe. Der gerade und aufrechte Embryo hat eine grundständige Radicula und seine Kotyledonen sind ölhaltig.

B Überblick über Eigenschaften und Inhaltsstoffe von Tectona grandis L. fil.

Tectona grandis L. fil. stellt als Lieferant des Teakholzes, eines der ältesten und wertvollsten Nutzhölzer, zumindest in kommerzieller Hinsicht den wichtigsten Vertreter seiner Familie dar. Schon der Gattungsname, der sich vom lateinischen "tectonicus" ableitet, deutet auf die frühe Verwendung des Holzes für konstruktive Zwecke hin, die insbesondere beim Schiffbau lange Zeit große Bedeutung hatte. Neuere Untersuchungen führten zu der Annahme, daß der Teakbaum ursprünglich nur in Indien heimisch war und erst von den hinduistischen Mönchen in frühgeschichtlicher Zeit als Kultbaum in die neuen Kolonialgebiete eingeführt wurde. Dadurch würde auch die trotz der vielen unterschiedlichen Dialekte auf allen indonesischen Inseln und in Südindien verwendete einheitliche Bezeichnung "djati" erklärt. Heute wird Tectona grandis L. fil. in allen tropischen Ländern kultiviert und man findet Wirtschaftswälder auch in Afrika und Lateinamerika.

Die vielseitige Verwendbarkeit des Teakholzes beruht darauf, daß es eine Reihe von günstigen Eigenschaften in sich vereint: Trotz relativ großer Härte läßt es sich leicht verarbeiten. Es ist weitgehend resistent gegen Termitenfraß und Pilzbefall und wird nur von wenigen Seetieren angegriffen. Auch ist es sehr widerstandsfähig gegen mechanische Abnutzung und viele Chemikalien. Obgleich das spezifische Gewicht des Holzes normalerweise in frisch gefälltem Zustand größer als das des Wassers ist, kann es durch die sogenannte "girdling"-Behandlung trotzdem schwimmbar gemacht werden. Dabei werden Rinde und Splintholz am unteren Stamm des lebenden Baumes abgeringelt, so daß dieser in wenigen Tagen abstirbt. Anschließend werden die Stämme bis zur vollständigen Trocknung noch etwa zwei

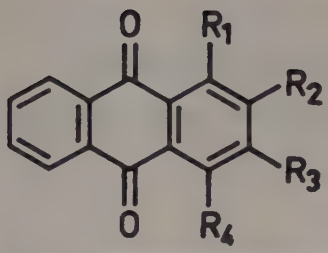
Jahre stehengelassen.

Auch gibt es zahlreiche Angaben über eine medizinische Verwendung fast aller Pflanzenteile in der indomalaischen Volksmedizin. Häufig werden äußerlich oder auch innerlich anwendbare Zubereitungen bei verschiedenartigen entzündlichen Prozessen empfohlen. Eine ausführliche Zusammenfassung gibt BREITWIESER (1942) in seinen pharmakognostischen Untersuchungen über Verbenaceae.

Die Indonesier erkannten schon sehr frühzeitig Qualitätsunterschiede und unterschieden drei Arten von Teakholz durch die genannten Merkmale:

Djati sempoerna:	Teak von geringer Qualität, verursacht Hautjucken
Djati koesoema:	mittlere Qualität, hat geflammtes Aussehen
Djati wangi:	Teak von bester Qualität, zeichnet sich durch angenehmen Geruch aus

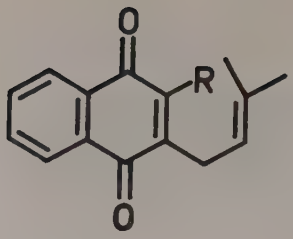
Es ist daher an sich verwunderlich, daß erst seit 20 Jahren chemische Untersuchungen des Teakholzes intensiv durchgeführt werden. Früher war angenommen worden, daß die Dauerhaftigkeit des Holzes nur von physikalischen Eigenschaften, wie Härte und hoher Dichte, herrührte. Heute weiß man dagegen, daß dafür auch seine chemischen Inhaltsstoffe entscheidend mitverantwortlich sind. Im Jahre 1920 brachte man erstmals eine auch bei anderen Hölzern beobachtete Termitenresistenz mit im Holz vorhandenen giftigen Stoffen in Zusammenhang. Erst 1957 stellten SANDERMANN und DIETRICHS die Termitenwirksamkeit von Tectochinon (I) fest, das bereits von ROMANIS 1887 isoliert und 1932 von KAFUKU und SEBE als 2-Methylanthrachinon erkannt worden war. Seitdem konnten etwa 40 neue Verbindungen - zum über-



ANTHRACHINONE
aus Tectona grandis L. fil.

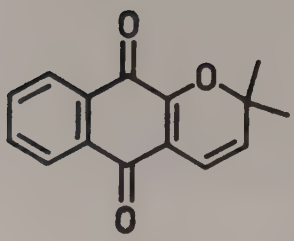
	R_1	R_2	R_3	R_4	
I	H	CH_3	H	H	Tectochinon
II	H	CH_3	OH	H	2-Methyl-3-hydroxyanthrachinon
III	OH	CH_3	H	H	1-Hydroxy-2-methylanthrachinon
IV	OH	CH_3	H	OH	1,4-Dihydroxy-2-methylanthrachinon
V	H	CH_2OH	H	H	2-Hydroxymethylanthrachinon
VI	H	CHO	H	H	Anthrachinon-2-aldehyd
VII	H	COOH	H	H	Anthrachinon-2-carbonsäure

wiegenden Teil von SANDERMANN und SIMATUPANG (1962, 1963, 1965, 1966, 1967) - im Interesse der Holzforschung zumeist direkt aus dem Holz von Tectona grandis L. fil. isoliert und vielfach neben der chemischen Konstitution auch ihre biologische Wirksamkeit aufgeklärt werden. Dabei erkannte man, daß die Inhaltsstoffe je nach Alter und Standort der Bäume in stark schwankenden Konzentrationen vorliegen, wodurch die Qualitäts-

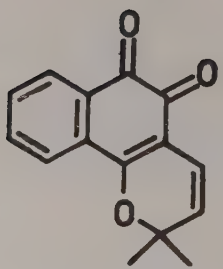


NAPHTHOCHINONE
aus Tectona grandis L.fil.

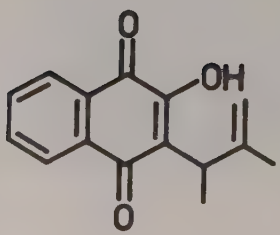
R = OH = Lapachol (VIII)
R = H = Desoxylapachol (IX)



= α-Dehydrolapachon (X)



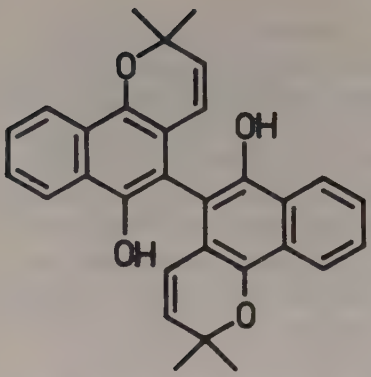
= ß-Dehydrolapachon (XI)



= "Chinon A_7" (XII)

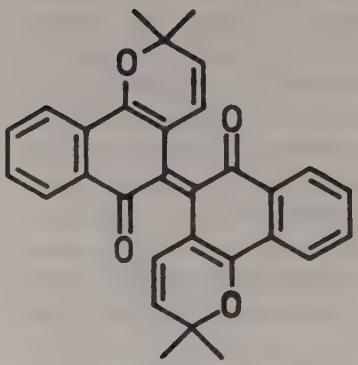
unterschiede des Holzes verursacht werden. Um diese Erscheinung zu erklären, sind in letzter Zeit Mutmaßungen über die Existenz natürlicher oder kultigener chemischer Rassen innerhalb der Art angestellt worden. Die genauere Kenntnis dieser Zusammenhänge würde es ermöglichen, zum Nutzen der Forstwirtschaft gezielte Züchtungsversuche zu unternehmen. Diese könnten entweder durch die schon heute bekannte chemische Selektion von Mutterbäumen oder später eventuell sogar durch direkte genetische Steuerung der Inhaltsstoffe vorgenommen werden.

Einen umfassenden Überblick über die bisher aus Tectona grandis L. fil. isolierten Substanzen gibt HEGNAUER (1973). Es handelt sich vor allem um Anthrachinone (I bis VII), Naphthochinone (VIII bis XII), dimere Naphthochromane (XIII und XIV) und noch unaufgeklärte chinoide Verbindungen. Neben Tectochinon wurden weitere sechs Anthrachinone gefunden, die sich von 2-Methylanthrachinon durch Hydroxylierung oder Oxidierung ableiten lassen. Ihnen allen ist eine termitenabwehrende Wirkung gemeinsam, wohingegen die Naphthochinone, wie das Lapachol (VIII) und seine Desoxy- und Dehydroderivate, fungizid wirken. Die letzteren und dabei in besonderem Maße das Desoxylapachol (IX) wurden als ekzemverursachende allergene Komponente mancher Teakvarietäten erkannt. Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Teakholzes, der allerdings ebenfalls großen Gehaltsschwankungen unterliegt (0,1 bis 5 %), ist der Kautschuk. Sein günstiger Einfluß auf die Holzqualität, insbesondere hinsichtlich des Abnutzungswiderstandes und der Verwendbarkeit des Holzes für Schwefel- und Salzsäurebehältnisse, gilt als erwiesen. Weiterhin berichten SANDERMANN und SIMATUPANG (1966) über das Vorkommen von terpenoiden Verbindungen im Holz: Squalen, Betulinsäure, einem Triterpen der Summenformel $C_{30}H_{48}O_5$ und zwei weiteren Terpenoiden. Außerdem wurden zu etwa 1 % Fettsäuren, 0,15 % ätherisches Öl und in grö-



DIMERE NAPHTHOCHROMANE
aus Tectona grandis L. fil.

= Tectol (XIII)

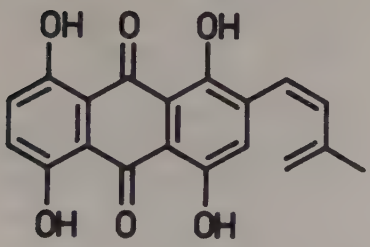


= Dehydrotectol (XIV)

ßeren Mengen Kalziumphosphat-Einschlüsse und Kieselsäureablagerungen festgestellt.

Den Blättern von Tectona grandis L. fil. ist bei den bisherigen chemischen Untersuchungen nur wenig Beachtung geschenkt worden. In der Literatur wird von fünf Chinonen noch unbekannter Struktur berichtet, die lediglich papierchromatographisch nachgewiesen wurden. Daneben wurde 1965 Tectoblattchinon (XV)

von AGARWAL et al. beschrieben, dessen Struktur jedoch umstritten ist. Das Vorkommen von roten und gelben Farbstoffen in Teakblättern ist in Indien schon von altersher bekannt. So beruht eine alte Echtheitsprüfung für Teak auf der roten Verfärbung der Blätter nach ihrer Zerkleinerung und Vermischung mit Speichel. Wegen der chinoiden Pigmente fanden die Teakblätter in Indien auch verbreitete Verwendung als natürliches Färbemittel für Seide.



= Tectoblattchinon (XV)

C Diterpene - Strukturtypen und Biosynthese

DEVON und SCOTT führen in einem Handbuch von 1972 die bis zu dem Zeitpunkt bekannten 650 verschiedenen Diterpene natürlichen Ursprungs auf. Die Zahl der bekannten Diterpene vergrößert sich jährlich in zunehmenden Maße und zeigt, wie groß die Strukturvariabilität dieser Stoffgruppe ist. Bemerkenswert erscheint dabei die Tatsache, daß sich der überwiegende Teil der Diterpene - 80 bis 90 % - auf weniger als 20 verschiedene Grundtypen zurückführen läßt, so daß ein biogenetischer Zusammenhang als wahrscheinlich angenommen werden kann.

Die für die Biosynthese aller Terpenoide aufgestellte Isoprenregel (erstmals von WALLACH 1885 und RUZICKA 1953 erkannt), nach der aus Mevalonsäure gebildete "aktive Isopreneinheiten" zuerst eine Kettenbildung und später ihre Cyclisierung ermöglichen, ist auch für Diterpene grundlegend. Obwohl es in der Natur wichtige acyclische Diterpene, wie das in Chlorophyll enthaltene Phytol, gibt und monocyclische Vertreter, wie sie die Vitamine der A-Reihe darstellen, besitzt die Mehrzahl aller Diterpene einen bi-, tri- oder tetracyclischen Grundkörper. Es wird heute angenommen, daß diese Ringsysteme aus einer stufenweisen Cyclisierung des als Precursor dienenden Geranylgeranioldiphosphats (XVI) resultieren (HANSON 1971, COFFEY 1969). In diesem System der fortschreitenden Cyclisierung nehmen das Labdadienoldiphosphat (XVII) und das Pimaradien (XX) Schlüsselpositionen ein, aus denen sich durch Umlagerungen - meist Methylwanderungen - oder Bindungsbrüchen mit Ringerweiterung oder -verkleinerung alle anderen Grundtypen ableiten (siehe dazu Abb.5). Darüberhinaus weisen die Diterpene gegenüber Steroiden und Triterpenen insofern eine Besonderheit auf, als ihre Vertreter in zwei enantiomeren Formen vorliegen können, die von der unterschiedlichen Verknüpfung der Ringe A

und B herrühren. Außerdem kann an C(13) nach Wegfall der Doppelbindung ein zusätzliches Anomeriezentrum entstehen, aus dem sich epimere Verbindungen ableiten.

Für diesen außerordentlich großen Formenreichtum, der im Gegensatz zu den strengen Grundmustern von Triterpenen und Steroiden steht, werden Unterschiede in der Biosynthese verantwortlich gemacht. Bereits der erste Cyclisierungsschritt, der zwar immer vom gleichen Kettenende her beginnt, unterscheidet sich von denen niederer und höherer Terpene. Während bei Mono- und Sesquiterpenen die Cyclisierung in den meisten Fällen als Folge der Phosphatrest-Abspaltung eintritt, wird bei den Diterpenen der erste Schritt durch Protonierung der Doppelbindung ausgelöst (Abb.5), wohingegen bei den Triterpenen die Öffnung eines Epoxidrings die Cyclisierung einleitet. Das erklärt, warum die für Steroide und Triterpene charakteristische Sauerstoff-Funktion an C(3) den meisten Diterpenen fehlt. Bei den sich anschließenden intramolekularen Additionen an die Doppelbindungen, bei der die Chiralitätszentren von C(5), C(8), C(9) und C(10) festgelegt werden, sind dann offenbar zwei Arten der Enzymanheftung möglich, so daß enantiomere Reihen entstehen: die mit der "normalen" für Steroide typischen 10ß-Konfiguration und die mit einer sich dazu spiegelbildlich verhaltenden 10α-Konfiguration. Erst in einem zweiten Cyclisierungsschritt wird der Diphosphatrest abgespalten, und das dabei gebildete Carbonium-Ion führt zur Entstehung der tricyclischen Pimaran-Derivate (XX). Aus einem C(13)-epimeren Pimaradien leiten sich schließlich die tetracyclischen Diterpene ab. WENKERT schlägt 1955 ein Carbonium-Ion (XXa) als Zwischenstufe vor, das sich in unterschiedlicher Weise stabilisieren kann und dadurch die drei wichtigen tetracyclischen Strukturtypen Kauran (XXVI), Beyeran (= Stachan) (XXVII) und Atisan (XXVIII) bildet. Das Auffinden von pentacyclischen Trachyloban-Abkömmlingen (XXV) (HUGEL et al. 1965) könnte als Beweis dieser

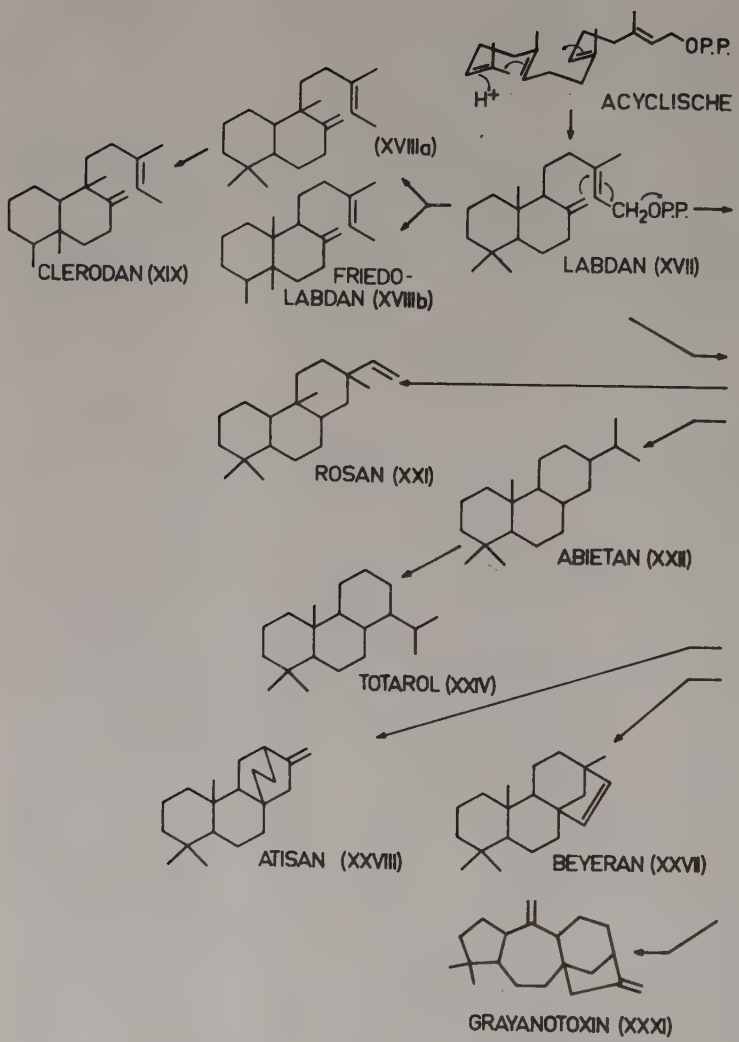
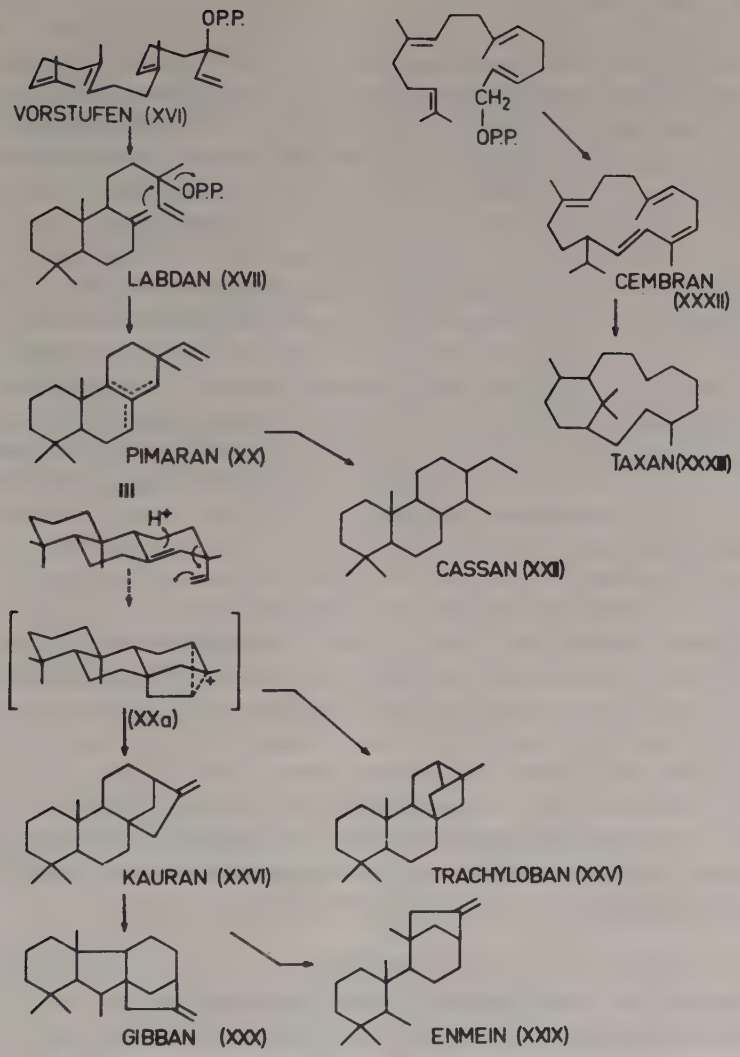


Abb.5 Biogenese der wichtigsten Diterpen-Typen


OPP.
VORSTUFEN (XVI)
OPP.
LABDAN (XVII)
CH2
OPP.
CEMBRAN (XXXII)
TAXAN(XXXIII)
PIMARAN (XX)
CASSAN (XXI)
III
H+
(XXa)
KAURAN (XXVI)
TRACHYLOBAN (XXV)
GIBBAN (XXX)
ENMEIN (XXIX)

Theorie angesehen werden.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Theorien für mögliche Biosynthesewege aufgestellt. Die praktischen Beweise durch Versuche mit lebenden Pflanzen scheitern jedoch immer noch an den zu geringen Einbauraten der radioaktiv markierten Substanzen, weil die physiologischen Voraussetzungen für Aufnahme und Transport sowie Ort und Zeit der Biosynthese nur unzureichend bekannt sind. HENDERSON und McCRINDLE gelang zwar 1969 bei Versuchen mit Marrubium vulgare der Einbau von 2-^{14}C-Mevalonolactat in das bicyclische Diterpen Marrubiin - dieses stellte sich aber später als ein bei der Isolierung entstandenes Artefakt heraus. Weitaus bessere Ergebnisse ließen sich dagegen bei Versuchen mit Pilzen erzielen. So konnten BIRCH et al. (1959) und ACHILLADELIS und HANSON (1968 und 1969) durch Versuche mit Tricothecium roseum zeigen, daß das bicyclische Labdadienoldiphosphat (XVII) die direkte Vorstufe in der Biosynthese von Rosenonolacton bildet. Dieser tricyclische Pilzmetabolit besitzt ein Friedo-Pimaran Grundgerüst (= Rosan) (XXI) und bei den Versuchen mit mehrfach markierten Mevalonaten konnte gleichzeitig auch die Methylwanderung von C(10) nach C(9) bewiesen werden. Diese Wagner-Meerwein-Umlagerung, die in anderen Fällen auch eine zweite Methylwanderung von C(4) nach C(5) nach sich ziehen kann, führt bei den bicyclischen Diterpenen zum Friedo-Labdan- (XVIII) und Clerodan-Typ (= Kolavan) (XIX). Außerdem konnte dadurch, daß höher oxidierte Verbindungen später als die entsprechenden weniger oxidierten radioaktiv wurden, nachgewiesen werden, daß Oxidationen bei der Diterpenbiosynthese Sekundärprozesse darstellen.

Noch umfassender wurde die Biosynthese der Gibberelline (XXX) erforscht, die wegen ihrer hormonartigen Wirkung auf das Pflanzenwachstum auch von wirtschaftlichem Interesse sind. Durch den Nachweis des Einbaus von markierter Essigsäure und

Mevalonsäure im Molekül wurde ihre Diterpenstruktur bewiesen. Bei umfangreichen Versuchen mit Gibberella fujikuroi (CROSS 1968) gelang es ferner, ihre stufenweise Cyclisierung von Geranylgeranioldiphosphat (XVI) über Labdadienoldiphosphat (XVII) und ent-Kauren (XXVI) zu verfolgen. Erstaunlicherweise wurden aber markierte ent-Pimaradiene (XX) nur in sehr geringen Raten eingebaut, weshalb die tricyclische Zwischenstufe als eine enzymgebundene Reaktion angesehen wird.

Durch andere Bindungsbrüche im Kauran-Skelett (XXVI) sind auch der Grayanotoxin- (XXXI) und der seltene Enmein-Typ (XXIX) ableitbar. Dagegen läßt sich die Biosynthese des Cembran-Typs (XXXII) und der verwandten Taxane (XXXIII) nur auf eine grundsätzlich andersartige Cyclisierung zurückführen, die wahrscheinlich in einer cis-substituierten Doppelbindung der acyclischen Vorstufe begründet ist.

Diterpene - Vorkommen und taxonomische Bedeutung bei den Lamiales

Bei einer Bestandsaufnahme der bis heute aus Pflanzen isolierten Diterpene lassen sich nur schwer allgemeingültige Zusammenhänge zwischen Diterpenvorkommen und Strukturformen einerseits und der bestehenden Pflanzensystematik andererseits erkennen. Neben der für ihre zahlreichen Diterpene bekannten Ordnung Pinales wurde nicht nur in sehr vielen Familien der Angiospermae, sondern auch in Farnen und Flechten Diterpenvorkommen festgestellt. Dabei liegen oftmals innerhalb einzelner Familien oder sogar innerhalb der selben Art mehrere Strukturtypen nebeneinander vor, die sowohl in der Anzahl ihrer Ringe als auch in der Art der A/B-Ringverknüpfung und der Konfiguration an C(13) - ja sogar in der Stereochemie einer Oxidation an C(4) variieren können, wie beispielsweise die diterpenoiden Inhaltsstoffe von Agathis australis (Abb.6) zeigen.

Grundsätzlich kann davon ausgegangen werden, daß Geranylgeranioldiphosphat, die acyclische Vorstufe sämtlicher Diterpene, in allen Pflanzen vorkommt und daß darüberhinaus jeder Pflanze auch ein Enzymsystem zur Verfügung steht, das sie zur Synthese kompliziert gebauter ent-Kaurene und Gibberelline befähigt (PONSINET et al. 1968); denn Diterpenstrukturen sind an wichtigen in Pflanzen ablaufenden biochemischen Prozessen beteiligt. Sie stellen nicht nur die Alkoholkomponente der Chlorophylle und die Vorstufe der Carotinoide, von deren Existenz alle photosynthetisch aktiven Pflanzen abhängig sind, sondern kommen auch in Form der Gibberelline als Wachstumshormone wahrscheinlich ubiquitär vor. Um als Hormone zu wirken, brauchen sie allerdings nur in minimalen Mengen synthetisiert zu werden und können für eine chemotaxonomische Bewer-

tung außer Betracht bleiben. Die im Gegensatz dazu in relativ großen Mengen als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe isolierten Diterpene, welche aus physiologischer Sicht meist abnorme Formen darstellen, stammen - wie OURISSON (1973) annimmt - aus einer unkontrollierten Überproduktion. Im Laufe der Evolution können diese Diterpenformen jedoch durchaus zu einer positiven Selektion geführt haben, weil sie über die Indifferenz von bloßen Metaboliten hinaus - möglicherweise zufällig - biologische Aktivitäten besaßen. So sind für Diterpene häufig ausgeprägte biologische Wirkungen festgestellt worden, die von einer allgemeinen Schutzfunktion der Harzsäuren bei äußeren

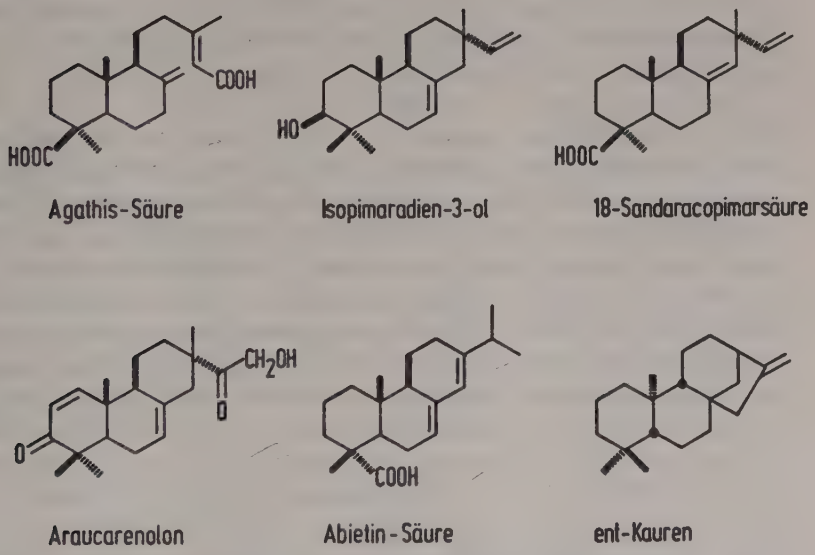


Abb.6 Übersicht über die diterpenoiden Inhaltsstoffe von Agathis australis (Araucariaceae)

Verletzungen und gegen mikrobiellen Angriff bei den Pinaceae bis zur spezifischen Toxizität der Clerodendrum- und Caryopteris-Diterpene gegenüber phytophagen Larven reichen. Diese Funktionen sind dann auch oftmals an sehr spezielle Strukturformen gebunden, die in ihrer Verbreitung auf kleine Taxa beschränkt bleiben, wie im Fall der charakteristisch substituierten Clerodan-Derivate (siehe dazu Strukturen XLIX bis LVI) auf Clerodendrum- und Caryopteris-Arten.

Für eine Reihe anderer Diterpenformen ist eine ähnliche Taxonspezifität, die nicht notwendigerweise offensichtliche physiologische Wirkung haben, beschrieben worden. Das ist besonders bei solchen Strukturen der Fall, die einen längeren oder ungewöhnlichen Biosyntheseweg durchlaufen haben. Beispiele dafür bilden die Taxan-Abkömmlinge (XXXIII) der Taxaceae, die Cembran-Derivate (XXXII) der Euphorbiaceae und die Grayanotoxine (XXXI) der Ericaceae.

Bei den Lamiales, in denen Diterpene relativ häufig auftreten, kommt kein vergleichbarer durchgehender Strukturtyp vor. Vielmehr kann geradezu von einem besonderen Strukturreichtum gesprochen werden, wobei allenfalls eine Korrelation der Anzahl der Ringe mit der Zugehörigkeit zu einer der beiden enantiomeren Reihen festgestellt werden kann. Jedenfalls überwiegt nach OURISSON (1973) bei den Lamiaceae eine "normale" Konfiguration für die bi- und tricyclischen Diterpene, während alle bis heute bekannten tetra- und pentacyclischen Vertreter der ent-Reihe angehören.

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN - HAUPTTEIL

A Isolierung

Vortrennung und Aufstellung eines Isolierungsschemas

Um einen Überblick über die Anzahl und Verteilung der Inhaltsstoffe aus den Laubblättern von Tectona grandis L. fil. zu erhalten, wurde das getrocknete und zerkleinerte Blattmaterial nach der im Versuchsteil näher beschriebenen Methode mit Äthanol/Wasser-Gemischen erschöpfend extrahiert. Der daraus gewonnene Rohextrakt wurde an Celite gebunden und im Vakuum vollständig getrocknet. Anschließend konnten die Inhaltsstoffe aufgrund ihres unterschiedlichen eluotropen Verhaltens an Celite-Säulen grob vorgetrennt werden. Dazu wurden zunächst alle lipophilen Bestandteile durch Elution mit Hexan/Methylenchlorid 1:1 (FM 1) in einer lipophilen Fraktion angereichert bis das Eluat nahezu farblos blieb und danach die hydrophilen Extraktanteile durch Elution mit Methylenchlorid/Methanol 1:1 (FM 2) in einer hydrophilen Fraktion aufgefangen. Beide Fraktionen wurden nach dem Einengen im Vakuum dünnschichtchromatographisch analysiert. Die Chromatogramme ergaben eine Vielzahl wenig intensiv gefärbter Flecke, von denen keiner mengenmäßig besonders zu überwiegen schien. Lediglich einige rote und gelbe Farbstoffe sowie verschiedene Chlorophyllfraktionen traten bereits vor der Detektion mit Vanillin/Schwefelsäure sehr deutlich hervor. In einer Reihe von Vorversuchen wurden nun verschiedene Trägersubstanzen und Fließmittelsysteme bezüglich ihrer Trenneigenschaften und Verwendbarkeit für die präparative Säulenchromatographie getestet. Anhand dieser Ergebnisse war es möglich, ein Isolierungsschema (Abb.7) aufzustellen, mit dem zunächst versucht wurde, sämtliche Inhaltsstoffe zu erfassen. Es zeigte sich jedoch sehr bald, daß die

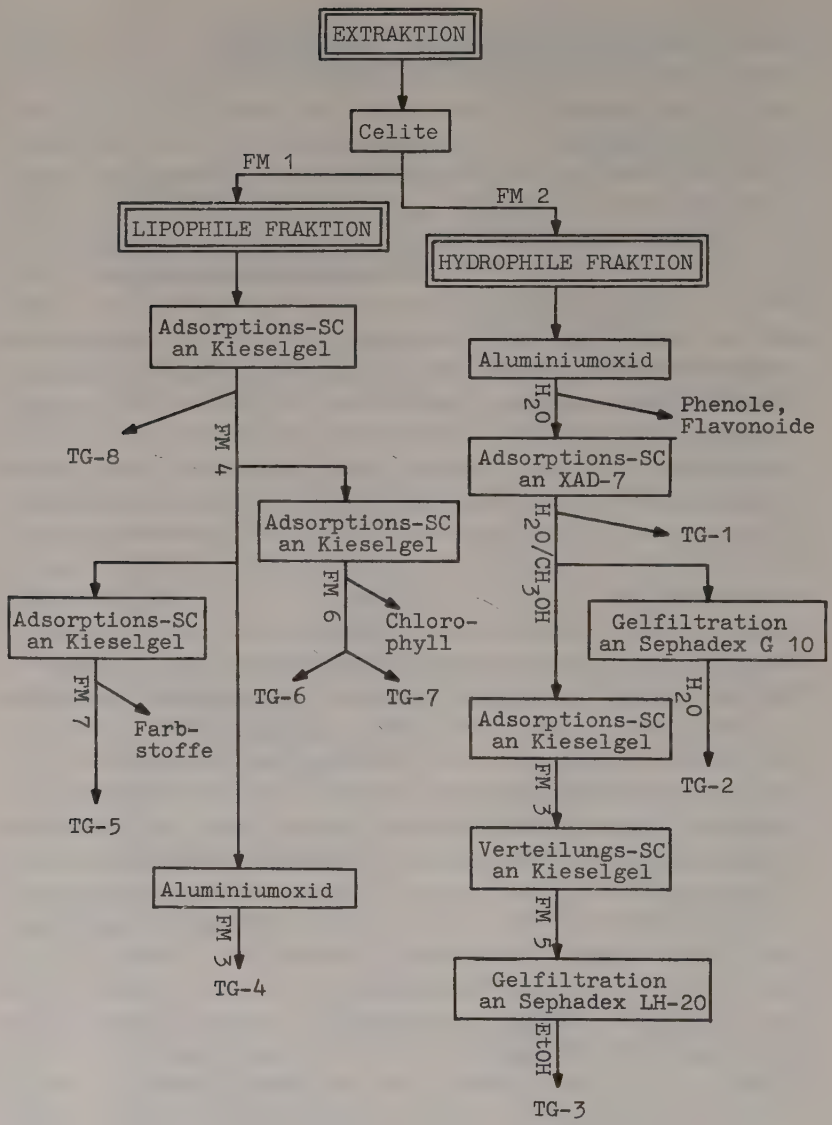


Abb.7 Isolierungsschema

meisten von ihnen in äußerst geringer Konzentration vorlagen (weniger als 0,001 %, bezogen auf das Trockengewicht des Blattmaterials) und einer Strukturaufklärung nur schwer zugänglich waren.

FM	Lösungsmittel	Verhältnis
1	Hexan/Methylenchlorid	1:1
2	Methylenchlorid/Methanol	1:1
3	Methylenchlorid/Methanol/Wasser	95:5:0,5
4	Methylenchlorid/Methanol/Wasser	98:2:0,2
5	Butanol/Toluol/Wasser (Oberphase)	3:2:5
6	Toluol/Chloroform	6:4
7	Cyclohexan/Essigester	1:1
8	Methylenchlorid/Methanol/Wasser	90:10:1
9	Toluol/Aceton	6:4
10	Tetrachlorkohlenstoff/Chloroform/ n-Propanol	50:50:3

Tab.1 Verzeichnis der Fließmittelsysteme (FM)

Aufarbeitung des hydrophilen Extraktanteils und Isolierung der Verbindungen TG-1 bis TG-3

Der hydrophile Extraktanteil wurde zunächst über Aluminiumoxid-Säulen mit Wasser als Eluens vorgereinigt. Dabei blieben Phenole, Flavonoide und verschiedene Farbstoffe auf den Säulen zurück. Durch anschließende phasenumgekehrte Adsorptionschromatographie an XAD-7, einem Adsorberharz aus Polystyrolpolymeren, gelang es durch ein Wasser/Methanol-Gemisch mit langsam ansteigender Methanolkonzentration drei Fraktionen abzutrennen.

Aus der hydrophilsten Fraktion schieden sich beim Eindampfen des Lösungsmittels weiße Kristalle ab, die gesammelt und zur weiteren Reinigung mehrere Male aus Methanol/Wasser umkristallisiert wurden. Die so isolierte Substanz zeigte auf der DC-Platte keine UV-Aktivität und war weder mit Vanillin/Schwefelsäure noch mit dem Zuckerreagenz Thymol/Schwefelsäure sichtbar zu machen. Da sie jedoch einen definierten Schmelzpunkt aufwies, konnte sie als einheitlich angesehen werden. Ihr wurde die Laborbezeichnung TG-1 zugeordnet.

Die zweite Fraktion stellte sich als Zuckerfraktion heraus. Nach der Entfernung des Lösungsmittels fiel ein gelber klebriger Lack an, der durch Gelfiltration über Sephadex G 10-Säulen gereinigt wurde. Aufgrund von dc- und pc-Prüfungen in verschiedenen Laufmitteln konnte der nun farblose Lack als aus zwei Zuckern (TG-2a und b) bestehend identifiziert werden.

In der sich als sehr komplex erweisenden dritten Fraktion wurden die zu suchenden Iridoide erwartet. Es wurde große Sorgfalt aufgewandt, um die in sehr kleinen Mengen vorliegenden und sich häufig überlagernden Verbindungen durch Kombina-

tion von adsorptions- und verteilungschromatographischen Verfahren einzeln zu erfassen. Nach systematischer Auftrennung der Fraktion durch Gradientenelution trat ein sich etwas rötlich gelbbraun mit Vanillin/Schwefelsäure anfärbender Fleck immer deutlicher hervor. Dieser konnte nach wiederholter säulenchromatographischer Auftrennung an Kieselgel im Verteilungssystem Butanol/Toluol/Wasser (3:2:5, Oberphase) im Vorlauf vieler Einzeltrennungen angereichert werden. Durch Reinigung über Sephadex LH-20 gelang es schließlich, eine dc-einheitliche Substanz zu isolieren, die die Bezeichnung TG-3 erhielt.

Wie aus Teil B ersichtlich sein wird, war trotz großer Ansätze und wiederholter Extraktion die von TG-3 isolierte Substanzmenge für eine vollständige Strukturaufklärung nicht ausreichend. Da die übrigen Substanzen in noch kleineren Konzentrationen vorlagen, und auch die sehr empfindliche Probe auf Iridoide nach TRIM und HILL (1952) negativ verlief, wurde auf die Isolierung weiterer Verbindungen dieser Fraktion verzichtet.

Aufarbeitung des lipophilen Extraktanteils und Isolierung der Verbindungen TG-8 bis TG-4

Die lipophilen Extraktanteile mußten zunächst von einer beträchtlichen Menge Chlorophyll gereinigt werden. Hierzu erwies sich eine Gradientenelution als besonders günstig, die an Kieselgel als Adsorbens und Methylenchlorid/Methanol/Wasser (Anfangskonzentration 98:2:0,2; Endkonzentration 80:20:2) als mobile Phase durchgeführt wurde. Dabei verfärbte sich der gesamte von der Fließmittelfront durchlaufene Kieselgelträger tiefbraun, was einen Rückschluß auf sich zersetzende Farbstoffe zuließ. Nach einem hellgelben Vorlauf (I) fiel die Hauptmenge des Chlorophylls in einem trüben dunkelgrünen Eluat (II) an. Es schloß sich eine leuchtend rotbraun gefärbte Fraktion (III) an, während die darauffolgende Fraktion (IV), von polareren Chlorophyllanteilen überdeckt, wieder grünbraun gefärbt war. Nach dieser Vortrennung wurden die Fraktionen einer dc-Prüfung unterzogen und ergaben das in der nachfolgenden Tabelle (Tab.2) dargestellte Spektrum. Die neben den grünen Chlorophyll- und roten Farbstofflecken vorhandenen Flecke TG-4, TG-5, TG-6 und TG-7 konnten durch Ansprühen mit Vanillin/Schwefelsäure sichtbar gemacht werden. Keine dieser Verbindungen zeigte UV-Aktivität.

Aus dem gelben Vorlauf I kristallisierten in der Kälte spontan weiße Plättchen aus, die auf der DC-Platte durch Vanillin/Schwefelsäure nur nach längerer Erwärmung schwach bläulich anfärbbar waren. Sie wurden zur Reinigung noch viermal aus Benzol/Petroläther (1:1) umkristallisiert. Ihnen wurde die Arbeitsbezeichnung TG-8 zugeordnet. Die Isolierung der Verbindungen TG-4 bis TG-7 wurde anschließend mit der weiteren säulenchromatographischen Auftrennung an Kieselgel fortgesetzt.

Fraktion	Bezeichnung	UV-Aktivität	Farbreaktion	hRf-Werte				
				FM 6	FM 7	FM 8	FM 9	FM10
I	TG-8	-	schwach blau	71,1	73,4	81,0	-	73,5
II	TG-7	-	gelbbraun → rotviolett	41,6	63,6	79,0	71,4	60,5
	TG-6	-	violett	17,5	54,5	71,1	64,0	36,4
III	TG-5	-	blau	10,8	44,9	67,1	58,3	25,3
IV	TG-4	-	rotbraun	-	1,8	26,9	16,6	-

Tab.2 DC-Spektrum nach der Gradientenelution des lipophilen Extraktanteils

Durch wiederholte Auftrennung der Chlorophyllfraktion II mit dem Fließmittel Toluol/Chloroform im Verhältnis 6:4 gelang es, im Nachlauf zwei Substanzen, TG-6 und TG-7, voneinander getrennt aufzufangen. TG-7 konnte in großen Nadeln aus dem in Methanol aufgenommenen Rückstand kristallisiert werden, während TG-6 nur als amorphes weißes Pulver und in sehr viel geringerer Ausbeute auszufällen war.

TG-5 konnte aus der Fraktion III im System Kieselgel/Fließmittel 7 (Cyclohexan/Essigester 1:1) von einer Reihe intensiv rot gefärbter Farbstoffe abgetrennt werden. Aufgrund seiner guten Kristallisationseigenschaften war es möglich, aus Methanol heraus lange weiße Nadeln zu gewinnen.

Bei der Fraktion IV, die die höchste Polarität aufwies, konnte eine Abtrennung der Chlorophylle nur auf Aluminiumoxid-Säulen mit Fließmittel 3 (Methylenchlorid/Methanol/Wasser 95:5:0,5) erreicht werden, nachdem Probetrennungen auf Kieselgel und acetyliertem Perlon erfolglos geblieben waren. Aus dem nach Verdampfen des Lösungsmittels noch immer grün gefärbten Rückstand konnten schließlich Kristalle gewonnen werden, die mit gekühltem Äther klargewaschen wurden. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Methanol/Wasser ergab sich eine dc-einheitliche Substanz, die mit TG-4 bezeichnet wurde.

B Identifizierung und Strukturaufklärung

Zur Strukturbestimmung wurde von den isolierten Verbindungen (siehe Abschnitt III A) jeweils das UV-, IR-, NMR- und das Massenspektrum angefertigt.

TG-1 - Identifizierung als meso-Inosit

Der höchste Peak des Massenspektrums tritt bei m/e = 181 auf. Deutet man ihn als (M+1)-Peak, ergibt sich für die Verbindung TG-1 ein Molekulargewicht von 180. Daneben weist das Spektrum in seinem oberen Bereich durch das Auftreten der Fragment-Ionen m/e = 163 und m/e = 144 lediglich auf zwei Wasserabspaltungen hin. TG-1 besitzt daher möglicherweise mehrere Hydroxygruppen. Diese Annahme wird vom IR-Spektrum durch die breite Absorptionsbande bei 3400 bis 3200 cm^{-1} sowie der starken C,O-Valenzschwingung bei 1055 cm^{-1} bestätigt. Da Banden im Carbonyl-Absorptionsbereich fehlen, kann das Vorhandensein einer Zuckerstruktur ausgeschlossen werden. Im Verwandtschaftskreis der Verbenaceae treten jedoch häufig Zuckeralkohole als Reservestoffe auf, so daß es naheliegt, für TG-1 die Struktur eines Hexits zu erwägen. Die nach dieser Hypothese wahrscheinliche Summenformel $C_6H_{12}O_6$ (Mol.-Gew. 180) läßt eine Ringstruktur (ein Doppelbindungsäquivalent) des Zuckeralkohols erwarten. Das führt zu der Vermutung, daß es sich bei TG-1 um das im Pflanzenreich verbreitete meso-Inosit (XXXIV) handelt.

Tatsächlich konnte beim Vergleich mit authentischem meso-Inosit "Merck" die Identität beider Verbindungen nachgewiesen werden. Bei der pc-Prüfung in drei verschiedenen Systemen wur-

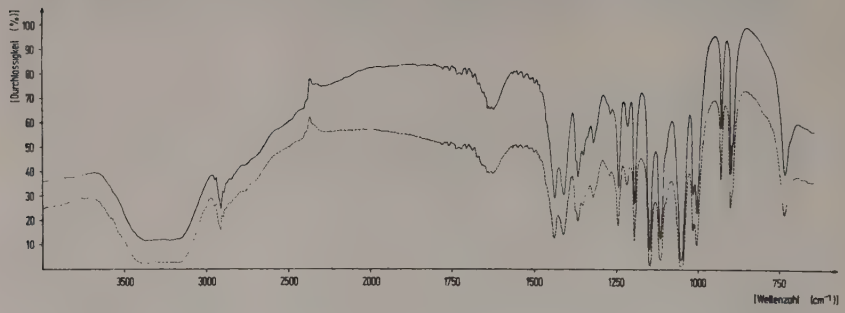
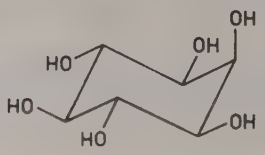


Abb.8 IR-Überlagerungsspektrum von TG-1 (——) und meso-Inosit "Merck" (---)

den keine Unterschiede festgestellt. Die Massenspektren weisen gleiche Bruchstückbildung auf, und die IR-Spektren stimmen in allen Einzelheiten überein, was aus dem Überlagerungsspektrum (Abb.8) deutlich hervorgeht. Bei der Bestimmung des Mischschmelzpunktes wurde keine Schmelzpunktdepression beobachtet.



meso-Inosit (XXXIV)

TG-2 - Identifizierung als Zuckergemisch

Von dem mit TG-2 bezeichneten farblosen Lack wurde zunächst angenommen, daß er einheitlich sei. Bei der pc-Überprüfung in speziellen Zuckerfließmitteln (HAIS und MACEK 1958) stellte sich jedoch heraus, daß es sich um zwei Verbindungen, TG-2a und b, handelte. Beide konnten sodann, ohne daß es einer Trennung bedurfte, allein durch chromatographischen Vergleich mit bekannten Zuckern eindeutig identifiziert werden. Ihre Rf-Werte stimmten in drei unterschiedlichen Fließmittelsystemen mit denen von Glucose bzw. Fructose überein, und es ergaben sich mit drei verschiedenen Sprühreagenzien jeweils gleichartige Anfärbungen. Damit ist die Identität von TG-2a mit Glucose und von TG-2b mit Fructose erwiesen.

TG-3 - Ansätze für eine Strukturaufklärung

Die Verbindung TG-3 wurde aus einer Fraktion des hydrophilen Extraktanteils isoliert, in der Iridoide zu erwarten waren. Auch das aufgenommene Massenspektrum weist für Iridoide typische Merkmale auf: Das höchste geradzahlige Fragment-Ion erscheint bei m/e = 244 und könnte dem Molekül-Ion des Aglykons entsprechen, da die Molekül-Ionen der Iridoidglykoside nur selten zu beobachten sind (BOBBITT 1969). Die von m/e = 244 ausgehende Fragmentierung (Abb.9) führt zunächst über die Abspaltung von 17 Masseneinheiten - wie sie auch bei der Oniumspaltung von Iridoiden festgestellt wird (WEINGES 1972) - zu einem Bruchstück der Masse m/e = 227 und dann weiter zu den intensiveren Fragment-Ionen m/e = 209, 196, 178, 167 und 149. Aus diesen Massendifferenzen kann auf das Vorliegen einer CH_2OH-Gruppe, einer weiteren Hydroxygruppe und einer Acetatgruppe geschlossen werden. Für alle drei Teilstrukturen gibt es noch weitere Anhaltspunkte: Die CH_2OH-Gruppierung wird zusätzlich durch den ungewöhnlich intensiven Peak der Massenzahl m/e = 31 (71 %) belegt, und auch im IR-Spektrum deuten starke OH-Valenzschwingungen bei 3550 bis 3200 cm^{-1} auf die Hydroxygruppen sowie eine breite "Estercarbonyl-Bande" bei 1730 cm^{-1} auf die Acetatgruppe hin. Ferner konnten beide Hydroxygruppen chemisch durch Acetylierung nachgewiesen werden. Bei dieser Reaktion wurde gleichzeitig der Zuckeranteil im Molekül acetyliert, was aus den für Glucosetetraacetat typischen Fragment-Ionen im Massenspektrum von TG-3 Ac klar ersichtlich ist (Auftreten der Massenpeaks m/e = 331, 271, 211, 169, 127, 109). Zusätzlich wurde die angenommene Glykosidstruktur durch saure Hydrolyse von TG-3 bewiesen, wobei die Identität des Zuckeranteils mit Glucose mittels pc-Analyse festgestellt werden konnte.

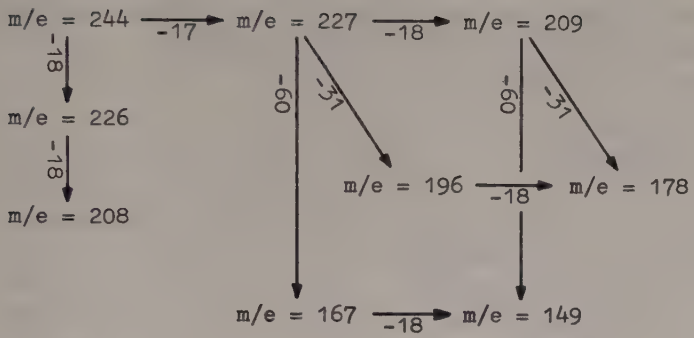
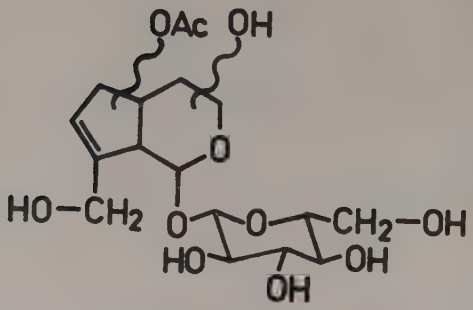


Abb.9 Massenspektrometrischer Abbau von TG-3

Weitere Derivatisierungen zur endgültigen Strukturaufklärung von TG-3 waren nicht möglich, weil die Verbindung nur in geringen Mengen isoliert werden konnte. Mit Sicherheit kann daher lediglich ausgesagt werden, daß die Verbindung TG-3 ein Glucosid darstellt, das neben einer Acetylgruppierung zwei acetylierbare Hydroxygruppen im Aglykon besitzt. Für den Fall daß eine Iridoidstruktur vorliegt, kann angenommen werden, daß es sich um das 3,4-Dihydroderivat eines C_9-Iridoids ohne Carboxylgruppe an C(4) handelt (XXXV). Einerseits ist nämlich keine UV-Absorption oberhalb 190 nm meßbar (Enoläther ohne C(4)-Carboxyl absorbieren bereits bei 207 bis 210 nm), und andererseits läßt auch die Interpretation des NMR-Spektrums keine Enoläthergruppierung zu (keine Protonenresonanz im Bereich δ = 7,5 bis 6,5 ppm für C(3)-H). Das IR-Spektrum macht jedoch eine Doppelbindung an anderer Stelle im Molekül wegen der Absorptionen bei 3000, 1640 und 890 cm^{-1} wahrscheinlich.

Für die vorliegende chemotaxonomische Arbeit ist entscheidend, daß Tectona grandis L. fil. Iridoide herkömmlichen Typs offenbar nicht akkumuliert.



hypothetische Iridoidstruktur von TG-3 (XXXV)

TG-8 - Identifizierung als Alkangemisch

Die in weißen wachsartigen Plättchen kristallisierende Verbindung TG-8 schmilzt bei 69 bis 70 °C. Das NMR-Spektrum ist auffällig einfach. Es zeigt lediglich bei δ = 1,27 ppm ein intensives Singulett sowie ein schwächeres bei δ = 0,9 ppm. Aus dem IR-Spektrum ist ersichtlich, daß funktionelle Gruppen offenbar völlig fehlen - was bereits aufgrund der nur durch extrem lange Erwärmung erzielten Anfärbbarkeit von TG-8 bei der dc-Untersuchung vermutet wurde. Das IR-Spektrum weist ebenso wie das NMR-Spektrum nur für Methyl- und Methylengruppen typische Absorptionsbanden auf. Das Massenspektrum ist durch auffällige Regelmäßigkeit gekennzeichnet: Im Abstand von 14 Masseneinheiten wiederholen sich gleichartige Peakgruppen mit ungeradzahligem Hauptpeak, deren Intensitäten nach höheren Massenwerten hin konstant abnehmen. Erst im obersten Bereich des Spektrums erscheinen zusätzlich geradzahlige Fragment-Ionen in vergleichbarer oder auch stärkerer Intensität. Alle diese Daten sprechen für das Vorliegen von langkettigen Paraffin-Kohlenwasserstoffen.

Eine Auftrennung des Gemisches war durch Gaschromatographie an einer Silikonsäule SE 30 möglich. Dabei ergaben sich drei Hauptkomponenten, die durch GC/MS-Kopplung als Pentatriakontan (Molekülionenpeak bei m/e = 492; $C_{35}H_{72}$), Tritriakontan (M^+ bei m/e = 464; $C_{33}H_{68}$) und als Hentriakontan (M^+ bei m/e = 436; $C_{31}H_{64}$) identifiziert werden konnten. Auch die geradzahligen Homologen sind in dem Gemisch vorhanden - wie Abb.10 zeigt jedoch in erheblich geringeren Konzentrationen. Anhand des Gaschromatogramms konnte aus dem Produkt von Höhe und Halbwertsbreite der Peaks näherungsweise die quantitative Zusammensetzung des Alkangemisches errechnet werden. Die Ergebnisse sind in Tab.3 zusammengefaßt.

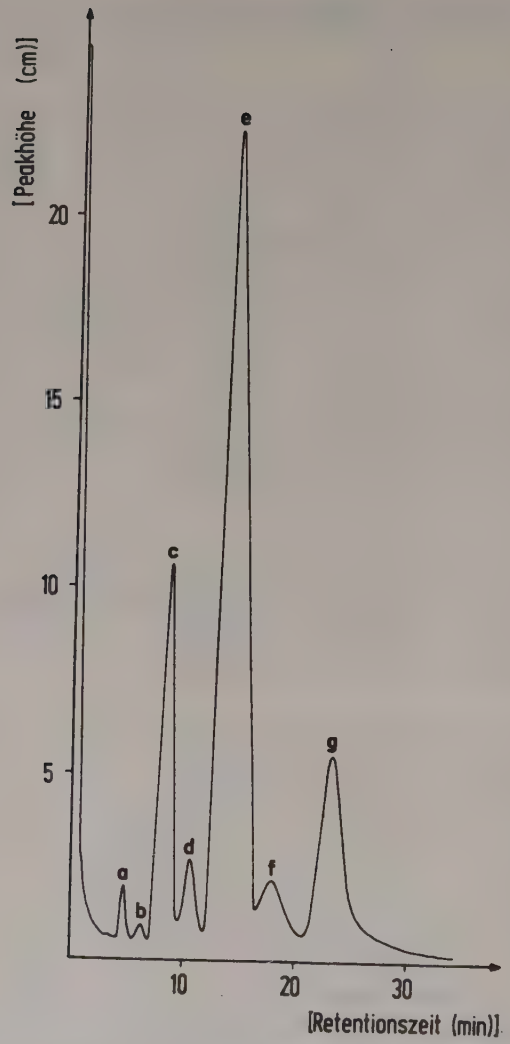


Abb.10 Gaschromatographische Auftrennung von TG-8

Alkane	Summen-formel	M^+ ($\frac{m}{e}$)	RRT	%	
n-Nonakosan	$C_{29}H_{60}$	408	0,45	0,5	a
n-Triakontan	$C_{30}H_{62}$	422	0,61	0,2	b
n-Hentriakontan	$C_{31}H_{64}$	436	0,81	20,7	c
n-Dotriakontan	$C_{32}H_{66}$	450	1,0	2,0	d
n-Tritriakontan	$C_{33}H_{68}$	464	1,33	65,2	e
n-Tetratriakontan	$C_{34}H_{70}$	478	1,69	2,8	f
n-Pentatriakontan	$C_{35}H_{72}$	492	2,19	8,6	g

Tab.3 Zusammensetzung des Alkangemisches (TG-8)
(RRT = rel. Retentionszeit, bezogen auf n-Dotriakontan)

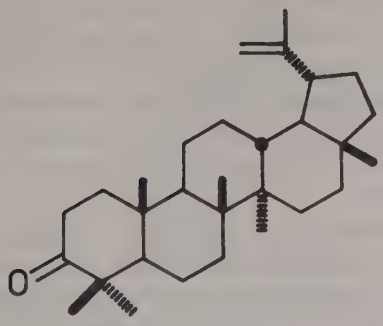
TG-7 und TG-6 - Identifizierung als Lupenon und Lupeol

Das Massenspektrum der Verbindung TG-7 zeigt einen deutlichen Molekülionen-Peak bei m/e = 424. Neben einer unspezifischen CH_3-Abspaltung (m/e = 409 = M-CH_3) treten keine für funktionelle Gruppen charakteristische (M-X)-Spitzen auf. Das IR-Spektrum gibt aufgrund einer starken Absorptionsbande bei 1690 cm^{-1} einen deutlichen Hinweis für die Existenz einer Ketogruppierung. Daneben läßt sich eine C,C-Doppelbindung aus der Bande bei 1625 cm^{-1} ableiten, die sich im Absorptionsbereich von nicht konjugierten Doppelbindungen befindet. Durch die außerdem auftretenden C,H-Valenzschwingungen bei 3040 cm^{-1} und die C,H-"out-of-plane"-Schwingungen bei 875 cm^{-1}, die für terminale Methylengruppen typisch sind, ist sie zusätzlich als endständige Doppelbindung charakterisiert. Diese Aussage wird auch durch das NMR-Spektrum bestätigt, das bei δ = 4,58 ppm und δ = 4,70 ppm zwei gleichartige jeweils einem Proton entsprechende Singuletts aufweist. Die zwischen geminalen Protonen an einer Doppelbindung auftretenden Kopplungskonstanten liegen bei 0,5 bis 3,5 Hz und machen sich hier lediglich durch eine Signalverbreiterung bemerkbar. Weil größere, vicinale Kopplungskonstanten fehlen, kann damit von einer einseitigen Disubstitution der Doppelbindung ausgegangen werden.

Alle weiteren Signale des Spektrums erscheinen bei sehr niedrigen Frequenzen unter 1,8 ppm mit Ausnahme eines nicht auflösbaren Multipletts bei δ = 2,45 ppm, das - wie aus der Integrationskurve zu entnehmen ist - für zwei Protonen steht, die wahrscheinlich durch die Nachbarschaft der Ketogruppe entschirmt sind. Im Bereich angularer Methylgruppen (0,8 bis 1,2 ppm) treten insgesamt fünf scharfe Singuletts auf, von denen eines für die doppelte Anzahl Protonen (6H) steht. Eine

siebte Methylgruppe erscheint als etwas verbreitertes Singulett bei δ = 1,71 ppm (3H). Der Grund für diese deutliche Verschiebung nach tieferem Feld könnte in einer Allylstellung zur bereits beschriebenen Doppelbindung liegen. Alle restlichen Protonen befinden sich als "Methylenberg" in einem breiten Multiplett bei δ = 1,4 ppm.

Aus den bisher gewonnenen Informationen kann geschlossen werden, daß die Verbindung TG-7 nur ein Sauerstoffatom im Molekül und mit großer Wahrscheinlichkeit ein polycyclisches Grundgerüst besitzt, so daß sechs Methylgruppen an quartären Kohlenstoffen substituiert sein können. Damit ergibt sich aus demMolekulargewicht als plausibelste Summenformel $C_{30}H_{48}O$. Die resultierenden sieben Doppelbindungsäquivalente müßten nach Abzug einer C,C- und einer C,O-Doppelbindung in fünf Ringen untergebracht sein, so daß sich ein pentacyclisches Triterpen herleiten läßt. Nach Berücksichtigung der angenommenen Isopropenyl-Gruppierung kommt nur ein Derivat der Lupan-Gruppe infrage. Es ist sehr wahrscheinlich, daß dieses Lupenon mit dem aus Pflanzen schon oft isolierten Δ^{29}-Lupen-3-on (XXXVI) identisch ist.



Lupenon (XXXVI)

Die Verbindung TG-6 ist, wie die dc-Prüfung zeigt, etwas hydrophiler als TG-7. Sie unterscheidet sich von TG-7 in ihrem Molekulargewicht um zwei Masseneinheiten (M^+ = 426). Zusätzlich zur Methyl-Abspaltung (M-CH_3 = 411) ist im Massenspektrum von TG-6 eine Wasser-Abspaltung durch die Fragment-Ionen m/e = 408 (= M-H_2O) und m/e = 393 (= M-(CH_3+H_2O)) zu erkennen. IR- und NMR-Spektren weisen große Ähnlichkeit mit den Spektren von TG-7 auf. Es fehlen jedoch die für eine Ketogruppe typischen Absorptionen - stattdessen erscheinen solche, die für eine Hydroxygruppe charakteristisch sind: Eine breite Bande von OH-Valenzschwingungen bei 3550 bis 3200 cm^{-1} im IR-Spektrum, sowie ein Multiplett bei δ = 3,2 ppm (1H, $W_{1/2}$ = 18 Hz) im NMR-Spektrum, das als koppelndes Proton neben OH gedeutet werden kann. Außerdem fällt im NMR-Spektrum auf, daß sich die chemische Umgebung einiger angularer Methylgruppen verändert hat. Die beiden CH_3-Gruppen, die im Keton TG-7 noch in einem Singulett bei δ = 1,09 ppm zusammengefallen waren, sind bei TG-6 weniger entschirmt. Sie erscheinen unterschiedlich weit nach höherem Feld hin verschoben, so daß hier insgesamt sechs Singuletts zu je 3H beobachtet werden. Zum Beweis der Hydroxygruppe wurde TG-6 mit Acetanhydrid in Pyridin acetyliert. Das vom Reaktionsprodukt TG-6 Ac hergestellte Massenspektrum zeigt auf eindeutige Weise, daß ein Monoacetat entstanden ist. Der Molekülionen-Peak hat sich um 42 Masseneinheiten auf m/e = 468 verschoben, und es treten Essigsäure-Abspaltungen sowohl vom Molpeak als auch vom (M-CH_3)-Peak auf, die durch die Fragment-Ionen m/e = 408 (= M-60) und m/e = 393 (M-(15+60)) belegt sind.

Aufgrund dieser Beobachtungen lag es nahe, für die Verbindung TG-6 einen dem Triterpen-Keton TG-7 korrespondierenden Triterpen-Alkohol anzunehmen. Wenn diese Annahme richtig war, mußte es möglich sein, beide Verbindungen in die jeweils andere durch Oxidation bzw. Reduktion zu überführen. Zu diesem

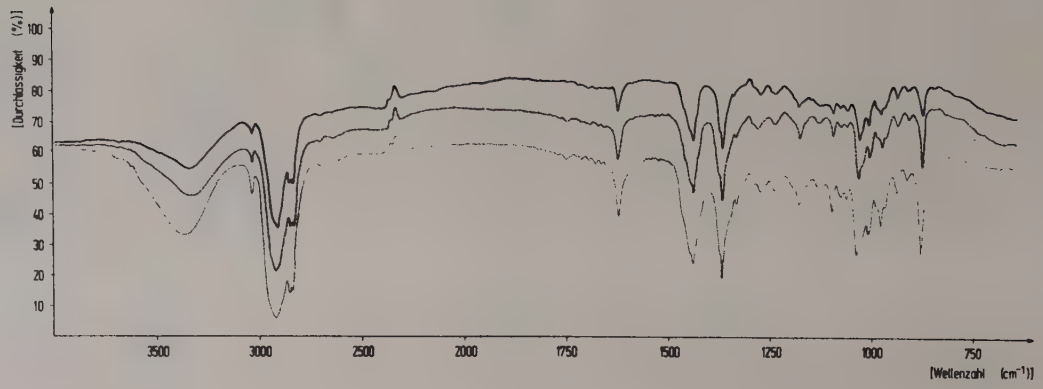
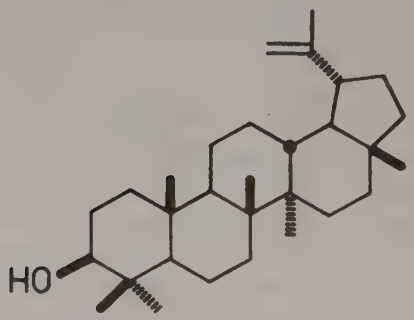


Abb.11 IR-Überlagerungsspektrum von TG-6 (——), TG-7 Red (---) und Lupeol (···)

Zweck wurde TG-6 mit Chromsäure-Pyridin-Komplex in Pyridin und TG-7 mit Natriumborhydrid in Äthanol umgesetzt. Die dc-Analyse der Ausgangs- und Reaktionsprodukte zeigte, daß jeweils die entsprechende andere Verbindung entstanden war. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurden IR- und Massenspektren der Verbindungen TG-6 Ox und TG-7 Red aufgenommen und mit denen von TG-7 und TG-6 verglichen. Dabei ergab sich Übereinstimmung in allen Einzelheiten. Hieraus kann geschlossen werden, daß TG-6 eine sekundäre Hydroxygruppe besitzt, die äquatorial ausgerichtet sein muß, weil bei der Reduktion von Ketonen mit komplexen Metallhydriden nach der Regel von BARTON (1953) der Reagenzangriff immer axial ansetzt und dadurch zur Bildung von ß-Alkoholen führt. Zusätzlich konnten die Spektren von authentischem Lupeol angefertigt und zum Vergleich mit herangezogen werden. Wie das IR-Überlagerungsspektrum von Lupeol, TG-6 und TG-7 Red (Abb.11) deutlich zeigt, sind TG-6 und Lupeol (XXXVII) identisch. Aus der sich gleichzeitig ergebenden Übereinstimmung mit TG-7 Red kann auch die Identität von TG-7 mit Lupenon (XXXVI) gefolgert werden.



Lupeol (XXXVII)

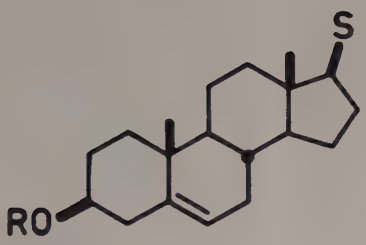
TG-5 - Identifizierung als Phytosteringemisch

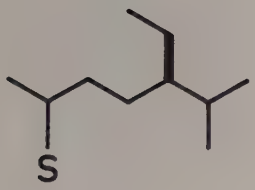
Die als TG-5 isolierte Substanz ist dc-einheitlich in drei verschiedenen Fließmittelsystemen. Sie kristallisiert in großen rechteckigen Plättchen, die bei 135 bis 138 °C schmelzen. Das IR-Spektrum zeigt neben starken CH-Valenz- und -Deformationsschwingungen (2960 bis 2870 cm^{-1}, 1465 cm^{-1}, 1380 cm^{-1}) das Vorhandensein von OH an, durch die breite Bande bei 3550 bis 3200 cm^{-1} sowie Absorptionen bei 1365 cm^{-1} (OH-Deformationsschwingungen) und 1060 cm^{-1} (CO-Valenzschwingungen). Aus den Banden bei 3030 cm^{-1} und 1640 cm^{-1} kann ferner das Vorhandensein von Doppelbindungen hergeleitet werden. Die "out-of-plane"-Schwingungen bei 960 cm^{-1} und 970 cm^{-1} sprechen für eine trans-substituierte und bei 800 cm^{-1} für eine monosubstituierte Doppelbindung.

Aus dem Massenspektrum geht jedoch eindeutig hervor, daß es sich bei der untersuchten Substanz um mehrere Verbindungen handeln muß, denn im Molekülionenbereich treten Differenzen von nur zwei Masseneinheiten auf. Die geradzahligen Ionen m/e = 414 und m/e = 412 stellen daher jeweils Mol-Peaks dar. Aber auch das Ion der Masse m/e = 400 ist als Isotopen-Peak zu intensiv und kommt als weiterer Mol-Peak in Betracht, weil 12 und 14 keine chemisch sinnvollen Massendifferenzen ergeben. Aufgrund dieser Annahme wurde eine Probe von TG-5 gaschromatographisch untersucht. Die Analyse bestätigt das Vorliegen von drei Verbindungen, die, wie sich durch graphische Integration der Peaks errechnet, im Verhältnis 10:6:1,3 vorliegen.

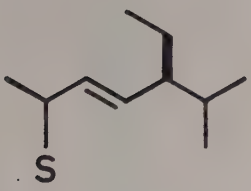
Nachdem sich eine präparative Trennung des Gemisches als äußerst schwierig herausgestellt hatte, wurde TG-5 ungetrennt derivatisiert und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Wegen der bereits als gesichert anzusehenden Hydroxy-

gruppe boten sich eine Acetylierung und eine Silylierung an, wobei die letztere durch ihre leicht flüchtigen und thermisch stabilen Derivate für die massenspektrometrische Untersuchung als besonders geeignet angesehen werden dürfte. Zu diesem Zweck wurden jeweils wenige Milligramm von TG-5 mit Acetanhydrid in Pyridin bzw. mit Hexamethyldisilazan/Chlortrimethylsilan in Chloroform umgesetzt und von den Reaktionsprodukten TG-5 Ac und TG-5 TMS die Massenspektren aufgenommen. Aus diesen Spektren (Abb.12) ist ersichtlich, daß alle drei Verbindungen des Substanzgemisches TG-5 eine Hydroxygruppe besitzen, denn in den Derivaten treten die Molekül-Peaks von TG-5 (m/e = 414, 412 und 400) nicht mehr auf. Stattdessen erscheinen im Acetat-Spektrum die Peaks mit den höchsten Massenzahlen bei m/e = 396, 394 und 382, die jeweils dem (M-60)-Peak entsprechen, und im Silyläther-Spektrum Molekülionen-Peaks, die um je 72 Masseneinheiten über den ursprünglichen Werten liegen und auf die Einführung eines Trimethylsilyl-Restes zurückzuführen sind. Bei der Interpretation der Spektren fällt auf, daß die Verbindungen offenbar große Ähnlichkeit miteinander haben. Die relativ einfachen Spektren sprechen für eine weitgehend parallel verlaufende Fragmentierung, die auch von den Derivatisierungen nur unwesentlich beeinflußt wird. Die auffälligsten Veränderungen sind daher auf die Lage der Mol-Peaks beschränkt, da bereits die ersten die Hydroxygruppe betreffenden Abspaltungen wieder zu bekannten Fragment-Ionen führen (siehe dazu Tab.4). Somit ist anzunehmen, daß alle drei Verbindungen an entsprechender Stelle im Molekül hydroxyliert sind und daß ferner alle nach Abspaltung eines C_{10}- bzw. C_9-Körpers das gleiche Grundgerüst besitzen. Es liegt also nahe, TG-5 für ein Steroidgemisch zu halten, wobei die drei Komponenten lediglich in der Struktur ihrer Seitenkette differieren. Als Phytosterine kommen für das Gemisch TG-5 die beiden C_{29}-Steroide ß-Sitosterin (Mol.-Gew. 414) (XXXVIII) und Stigmasterin (Mol.-Gew. 412) (XXXIX) infrage, sowie in

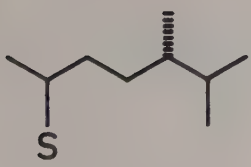




R = H = ß–Sitosterin (XXXVIII)
R = –C(=O)–CH_3 = TG-5a Ac
R = –Si$(CH_3)_3$ = TG-5a TMS



R = H = Stigmasterin (XXXIX)
R = –C(=O)–CH_3 = TG-5b Ac
R = –Si$(CH_3)_3$ = TG-5b TMS



R = H = Campesterin (XL)
R = –C(=O)–CH_3 = TG-5c Ac
R = –Si$(CH_3)_3$ = TG-5c TMS

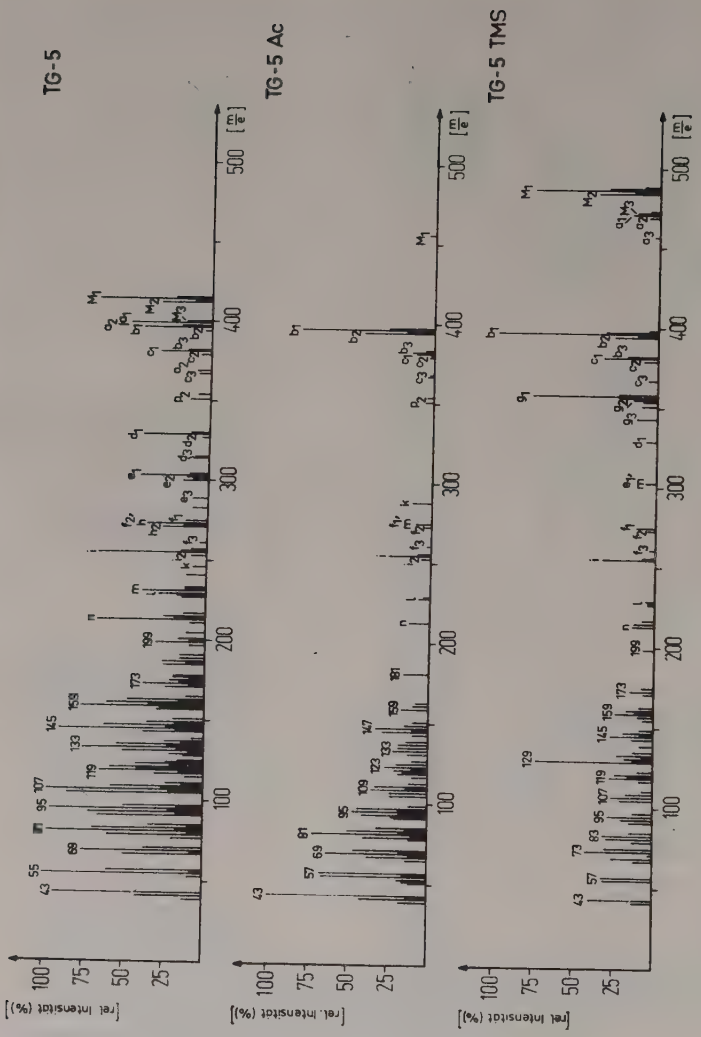


Abb.12 Massenspektren von TG-5, TG-5 Ac und TG-5 TMS

		TG-5			TG-5 Ac			TG-5 TMS		
		β Sitost. 1	Stigmasterin 2	Campest 3	β Sitos 1	Stigmasterin 2	Campe. 3	β Sitosterin 1	Stigmasterin 2	Campesterin 3
	M	414	412	400	456	-	-	486	484	472
a	M-CH_3	399	397	385	-	-	-	471	469	457
b	M-ROH	396	394	382	396	394	382	396	394	382
c	M-(ROH+CH_3)	381	379	367	381	379	367	381	379	367
d	M-(ROH+C_5H_7)	329	327	315	-	-	-	329	-	-
e	M-(ROH+C_7H_9)	303	301	289	-	-	-	303	-	-
f	M-(ROH+C_9H_{13})	275	273	261	275	273	261	275	273	261
g	M-C_3H_4OTMS	-	-	-	-	-	-	357	355	343
h	M-S	273	273, 271'''	273	-	-	-	-	-	-
i	M-(S+ROH)	255	255, 253''	255	255	255, 253''	255	255	255	255
k	M-(S+C_2H_3)	246	246	246	288	288	288	-	-	-
l	M-(S+ROH+C_2H_3)	229'	229'	229'	228	228	228	228, 229'	228, 229'	228, 229'
m	M-(S+C_3H_6)	231	231	231	273	273	273	303	303	303
n	M-(S+ROH+C_3H_6)	213	213	213	213	213	213	213	213	213
o	M-C_3H_7	-	369	-	-	-	-	-	-	-
p	M-(ROH+C_3H_7)	-	351	-	-	351	-	-	351	-

*) M-(S+RO+C_2H_3) **) M-(S+2 H+ROH) ***) M-(S+2 H)

Tab.4 Übersicht über wichtige Fragment-Ionen in den MS von TG-5, TG-5 Ac und TG-5 TMS

geringerer Konzentration auch das C_{28}-Steroid Campesterin (Mol.-Gew. 400) (XL). Durch Vergleich mit den in der Literatur (BUDZIKIEWICZ 1964, KNIGHTS 1967, SPITELLER-FRIEDMANN 1969) angegebenen Werten werden diese Vermutungen erhärtet und die Massenspektren damit eindeutig interpretierbar.

Der massenspektrometrische Abbau von Steroiden setzt entweder nach Ionisierung der C(3)-Hydroxygruppe an Ring A ein oder beginnt mit der Abspaltung der Seitenkette, worauf der Zerfall des Grundgerüstes von Ring D her folgt. Im ersten Fall kommt es zunächst zur Entstehung der Fragment-Ionen a, b und c (siehe dazu Abb.12 und Tab.4), die folglich für alle C(3)-Hydroxy-Steroide charakteristisch sind. Der weitere Abbau ist von der Lage der Doppelbindungen im Ring B abhängig. Die Fragment-Ionen d, e und f sind geeignet, um Δ^5-Steroide von den Δ^7-Steroiden zu unterscheiden, aus denen diese Fragment-Ionen nicht gebildet werden. Während bei Δ^7-Steroiden, bei denen sich durch eine (M-60)-Abspaltung kein konjugiertes Dien bildet, regelmäßig stabile Acetat-Molekülionen-Peaks entstehen, treten diese bei den Δ^5-Isomeren nur selten auf. In besonderem Maße spezifisch für Δ^5-Steroide sind die (M-129)-Abspaltungen (Fragmentierung g) im Silyläther-Spektrum, die gewöhnlich auch mit einem intensiven Peak der Masse m/e = 129 gepaart sind.

Der Abbau über die Seitenkette und weiter von Ring D her führt zwangsläufig bei allen sich ausschließlich in der Seitenkette unterscheidenden Steroiden zu den gleichen Fragmentierungen (h bis n), d.h. primär zu m/e = 273 (= M-Seitenkette). Im Spektrum von TG-5 fällt zusätzlich ein ähnlich intensiver Peak der Masse m/e = 271 auf. Dieses Fragment-Ion zeigt eine Doppelbindung in der Seitenkette an, durch die bei der Kettenabspaltung zwei Wasserstoffatome aus dem Ringsystem nachgezogen werden. Einen zweiten wichtigen Anhaltspunkt für das Vor-

liegen eines Δ^{22}-Steroids in TG-5 liefern die Fragment-Ionen m/e = 369 und m/e = 351 (o und p), deren Auftreten Folge einer terminalen Isopropyl-Abspaltung ist. Zu dieser Alkylspaltung kommt es in der Seitenkette nur, wenn die Bindung C(24)-C(25) durch gleichzeitige Allylstellung geschwächt ist.

Damit wurde für TG-5 je ein C_{29}- und ein C_{28}-Δ^5-3ß-Hydroxysteroid und ein C_{29}-$\Delta^{5,22}$-3ß-Hydroxysteroid aus den Massenspektren hergeleitet. Zum Beweis der Identität mit ß-Sitosterin (XXXVIII), Campesterin (XL) und Stigmasterin (XXXIX) wurde authentisches Material in ähnlichem Mischungsverhältnis gaschromatographisch aufgetrennt. Das Ergebnis waren mit TG-5 übereinstimmende relative Retentionszeiten. Das gleichzeitige Spritzen von TG-5 und dem Referenzgemisch ergab lediglich Signalverstärkungen - nicht aber zusätzliche Peaks.

TG-4 - Strukturaufklärung und Stereochemie von Tectograndinol

Aus dem Massenspektrum und der Elementaranalyse ergibt sich für die Verbindung TG-4 die Summenformel $C_{20}H_{34}O_3$. Das entspricht vier Doppelbindungs-Äquivalenten. Da das IR-Spektrum keine Banden im Carbonyl-Absorptionsbereich aufweist, sollten die drei Sauerstoffatome als Hydroxy- oder Äthergruppen vorliegen. Äthergruppen konnten durch die Umsetzung mit Trifluoressigsäureanhydrid in Pyridin, bei der ein Tris-trifluoracetat (TG-4 TFAc) entsteht (Abb.17), ausgeschlossen werden. Da sich auch bei der Acetylierung mit Acetanhydrid in Pyridin unter milden Bedingungen (eine Stunde, Raumtemperatur) ein Triacetat (TG-4 Ac_3) bildet (Abb.16), ist wahrscheinlich keine der drei Hydroxygruppen tertiär.

Das NMR-Spektrum der Verbindung TG-4 (Abb.13) enthält bei δ = 4,93 ppm und δ = 4,77 ppm zwei breite Singuletts, die auf Protonen an einer exocyclischen Doppelbindung hinweisen, und bei δ = 5,9 ppm ein triplettähnliches Multiplett, das einem trisubstituierten Olefin zugeordnet werden kann (SUMIMOTO et al. 1964). Bestätigt werden diese Annahmen durch die IR-Absorptionsbanden bei 887 cm^{-1}, 1655 cm^{-1} und 3095 cm^{-1} für die exocyclische bzw. bei 862 cm^{-1}, 1672 cm^{-1} und 3010 cm^{-1} für die trisubstituierte Doppelbindung (NAKANISHI 1962) (Abb.14). Damit sind zwei der vier Doppelbindungs-Äquivalente zugeordnet. Die Verbindung TG-4 müßte demnach zwei carbocyclische Ringe enthalten. Bei Annahme einer Diterpen-Struktur, die durch Summenformel und NMR-Spektrum nahegelegt wird, kann sie nur ein Labdan- (XVII), Friedo-Labdan- (XVIIIa oder b) oder Clerodan-Grundgerüst (XIX) besitzen. Berücksichtigt man, daß das NMR-Spektrum drei scharfe Singuletts im Bereich um δ = 1 ppm (je 3H) aufweist, die drei isoliert stehenden Methylgruppen zugeordnet werden müssen, können die Grundgerüste XVIIIb und XIX

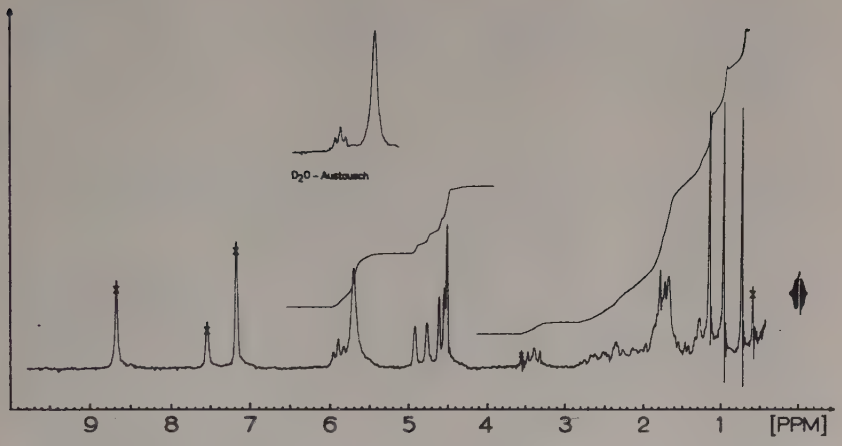


Abb.13 NMR-Spektrum der Verbindung TG-4

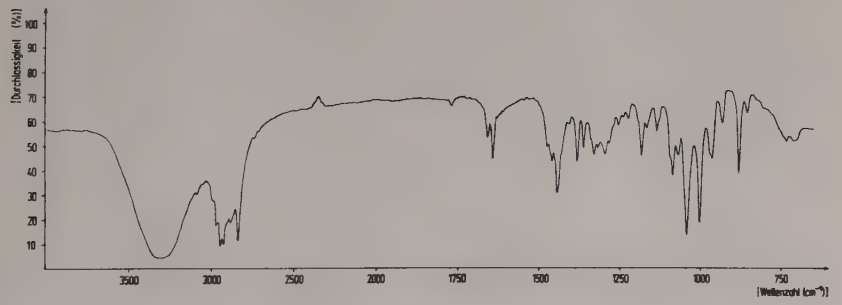


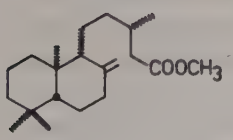
Abb.14 IR-Spektrum der Verbindung TG-4

ausgeschlossen werden. Diese könnten nämlich nur dann drei unaufgespaltene Methylsignale enthalten, wenn eine tertiäre Hydroxygruppe vorhanden wäre. Außerdem gibt das annähernd symmetrische Dublett der Banden bei 1370 cm^{-1} und 1390 cm^{-1} im IR-Spektrum einen deutlichen Hinweis auf geminale Methylgruppen (McMURRY u.THORNTON 1957), wie sie lediglich in den Diterpen-Typen XVII und XVIIIa vorkommen. Aus den Übersichten in Abb.15 und 18 über die wichtigsten Fragmentierungswege in den Massenspektren von TG-4 und dem Oxidationsprodukt TG-4 Ox I ist zu entnehmen, daß der Entstehung markanter Fragment-Ionen (Wege 4 und 5) (ENZELL u. RYHAGE 1965) Wasserstoffwanderungen von C(9) an Kohlenstoffatome der Seitenkette zugrundeliegen. Es muß das Vorliegen eines Labdan-Grundgerüstes (XVII) angenommen werden, da nur bei diesem ein Wasserstoffatom an C(9) zur Verfügung steht. Die Summenformeln der Fragment-Ionen konnten durch Hochauflösung der Massenspektren aufgeklärt werden (siehe dazu Tab.6 und 7) - die angegebenen Strukturen stellen lediglich wahrscheinliche Annahmen dar.

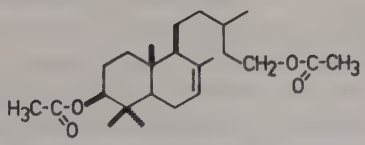
Der Basispeak des Massenspektrums der Verbindung TG-4 liegt bei m/e = 135 und stimmt für den Fall sehr gut mit dem Hauptfragmentierungsion überein, das von ENZELL und RYHAGE (1965) für Diterpene mit einer C(8), C(17)-Doppelbindung angegeben wird, wenn der dazu erforderliche Bruch der zu der Doppelbindung allylständigen Verknüpfungen C(9)-C(10) und C(6)-C(7) unter gleichzeitiger Eliminierung von Wasser verläuft. Dafür ist Bedingung, daß eine Hydroxygruppe in Ring A lokalisiert ist. Das entsprechende NMR-Signal für das Proton in geminaler Stellung zu dieser OH-Gruppe tritt bei δ = 3,4 ppm als triplett-ähnliches Multiplett mit einer Halbwertsbreite von 18 Hz auf. Dieser Halbwertsbreitenwert läßt sich entweder auf jeweils kleine Kopplungen (ax/eq oder eq/eq) mit insgesamt vier benachbarten Protonen oder aber auf das Auftreten einer kleinen neben einer großen Kopplung (ax/eq und ax/ax) zurückführen (WIE-

CHERT et al. 1966). Im ersten Fall würde das eine axiale Stellung der OH-Gruppe in 2 bedeuten, während der zweite Fall für eine äquatoriale Stellung der OH-Gruppe an C(1) oder C(3) zutreffen würde.

Die chemischen Verschiebungen angularer Methylgruppen lassen sich aus Inkrementen funktioneller Gruppen errechnen. Insbesondere durch Vergleich mit Methylresonanzen verwandter Verbindungen, wie Methyleperuat (XLVII) (HENRICK et al. 1965) und XLVIII (BOHLMANN 1976), sollte auch eine Zuordnung der Methylsinguletts von TG-4 und seinen Derivaten möglich sein, wie sie in Tab.5 versucht wird. Dabei zeigt sich eine relativ gute Übereinstimmung in der chemischen Verschiebung der Methylgruppen von TG-4 Ac_3 und dem 3ß-Hydroxy-Labdanderivat (XLVIII) sowie eine nahezu gleiche Lage des C(20)-H_3-Signals in TG-4, TG-4 Ox II und Methyleperuat (XLVII). Beim Übergang von Chloroform zu Pyridin als Lösungsmittel für TG-4 ist ferner ein deutlicher Lösungsmitteleinfluß auf die chemische Verschiebung zu beobachten: Die geminalen Methylgruppen werden entschirmt, während die C(20)-H_3-Gruppe praktisch unbeeinflußt bleibt. Eine weitere Veränderung der chemischen Verschiebung läßt sich durch Zugabe von $Eu(fod)_3$ als shift-Reagenz zur Meßlösung von TG-4 erzielen. Zwei Methylsignale werden dadurch wesentlich stärker nach tieferem Feld verschoben als das dritte Singulett (Tab.5). Da die Größe dieser Verschiebung mit der räumlichen



Methyleperuat (XLVII)



(XLVIII)

	C(18)-H_3	C(19)-H_3	C(20)-H_3
XLVII	0,88 a)	0,81 a)	0,69 a)
TG-4	1,01 a) 9,80 a)x) 1,14 b)	0,79 a) 8,61 a)x) 0,96 b)	0,71 a) 4,48 a)x) 0,73 b)
TG-4 Ac_3	0,87 b)	0,87 b)	0,67 b)
XLVIII	0,94 c)	0,86 c)	0,73 c)
TG-4 Ox I	1,03 a)	1,10 a)	0,88 a)
TG-4 Ox II	0,98 a)	0,76 a)	0,69 a)

a) in $CDCl_3$ b) in Pyridin-d_5 c) in Benzol-d_6
x) bei Zusatz von ca. 150 mg $Eu(fod)_3$ zu 0,5 ml Meßlösung

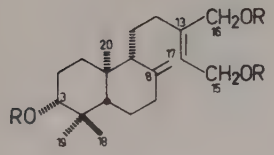
Tab.5 Zuordnung der Methylsinguletts aus den NMR-Spektren

Nähe zum paramagnetischen Komplex - und damit zur Hydroxygruppe - zunimmt, ist die vorgenommene Zuordnung gerechtfertigt und die Möglichkeit einer Substitution der Hydroxygruppe an C(1) ausgeschlossen.

Darüberhinaus konnten im durch Jones-Oxidation gebildeten Keton (TG-4 Ox I) die enolisierbaren Wasserstoffatome massenspektrometrisch bestimmt werden (BIEMANN 1962, SPITELLER 1966). Dazu wurde das Keton in einem Gemisch aus CH_3OD und D_2O gelöst, und auf diese Weise bei Zusatz von NaOD alle aciden Protonen gegen Deuterium-Ionen ausgetauscht. Nach dem Abdampfen des Al-

kohols konnte das deuterierte Keton durch Ausschütteln mit Aceton abgetrennt und der massenspektrometrischen Untersuchung zugeführt werden. Dabei ergab sich ein um zwei Masseneinheiten höher liegender Molekül-Peak. Ebenso konnte bei allen Fragment-Ionen, die den Ring A enthalten, eine Verschiebung um zwei Masseneinheiten im Vergleich zur undeuterierten Verbindung beobachtet werden, wie in Abb.18 dargestellt. Diese Ergebnisse beweisen die Lokalisation der sekundären Hydroxygruppe in α-Stellung zu den geminalen Methylgruppen an C(4).

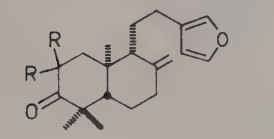
Zur Aufklärung der Seitenkette diente wiederum das NMR-Spektrum (Abb.13). Die chemischen Verschiebungen eines Singuletts zweier Protonen bei δ = 4,52 ppm und eines Dubletts zweier Protonen bei δ = 4,58 ppm deuten auf primäre OH-Gruppen in unmittelbarer Nachbarschaft einer Doppelbindung hin. Bei Doppelresonanz-Versuchen konnte das Dublett mit dem vinylischen Pro-



R = H =TG-4 (XLI)

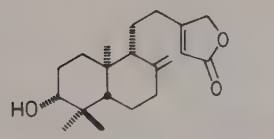
R = $-C(=O)-CH_3$ =TG-4Ac$_3$ (XLII)

R = $-C(=O)-CF_3$ =TG-4TFAc(XLIII)



R = H =TG-4Oxl (XLIV)

R = D =TG-4Oxl-d_2(XLV)



=TG-4Oxll (XLVI)

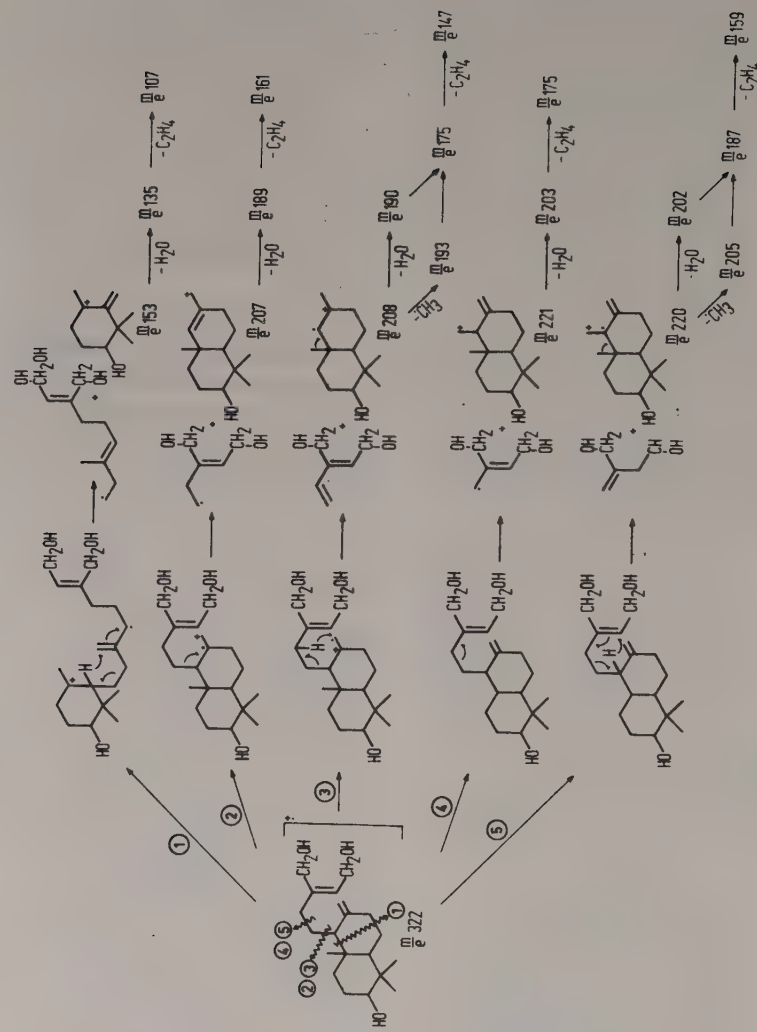
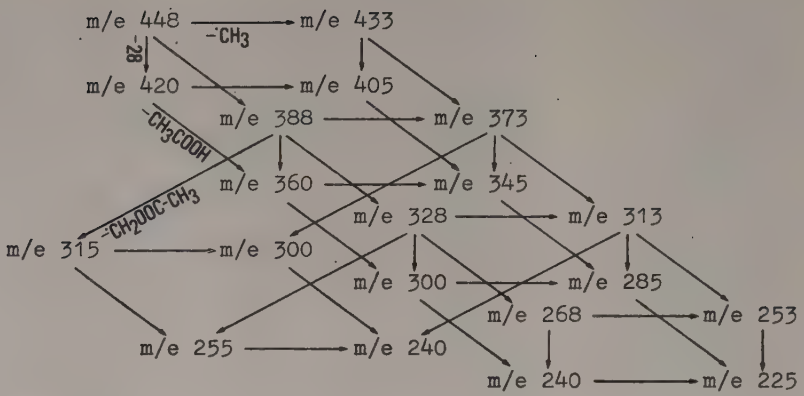


Abb.15 Wichtige Fragmentierungswege im MS von TG-4

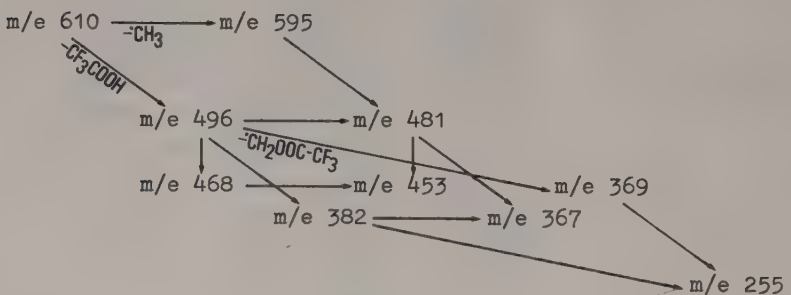
Zuordnung	Summenformel	ber.Masse	gef.Masse	%
M^+	$C_{20}H_{34}O_3$	322,2499	322,2299	2,5
M^+-CH_3	$C_{19}H_{31}O_3$	307,2265	307,2374	3
M^+-H_2O	$C_{20}H_{32}O_2$	304,2394	304,2371	23
M^+-CH_2OH	$C_{19}H_{31}O_2$	291,2316	291,2367	10
$M^+-(CH_3+H_2O)$	$C_{19}H_{29}O_2$	289,2160	289,2210	33
$M^+-2\ H_2O$	$C_{20}H_{30}O$	286,2289	286,2312	18
$M^+-(CH_2OH+H_2O)$	$C_{19}H_{29}O$	273,2211	273,2219	38
$M^+-(CH_3+2\ H_2O)$	$C_{19}H_{27}O$	271,2055	271,2084	34
$M^+-(CH_2OH+2\ H_2O)$	$C_{19}H_{27}$	255,2106	255,2140	20
Weg ①	$C_{10}H_{17}O$	153,1275	153,1292	10
	$C_{10}H_{15}$	135,1170	135,1133	100
	$C_8\ H_{11}$	107,0858	107,0820	49
Weg ②	$C_{14}H_{23}O$	207,1743	207,1839	14
	$C_{14}H_{21}$	189,1638	189,1631	9
	$C_{12}H_{17}$	161,1326	161,1245	15
Weg ③	$C_{14}H_{24}O$	208,1821	208,1925	4
	$C_{13}H_{21}O$	193,1587	193,1633	3
	$C_{14}H_{22}$	190,1716	190,1770	11
	$C_{13}H_{19}$	175,1482	175,1503	17
	$C_{11}H_{15}$	147,1170	147,1135	22
Weg ④	$C_{15}H_{25}O$	221,1899	221,1878	3
	$C_{15}H_{23}$	203,1794	203,1882	13
	$C_{13}H_{19}$	175,1482	175,1503	17
Weg ⑤	$C_{15}H_{24}O$	220,1821	220,1830	7
	$C_{14}H_{21}O$	205,1587	205,1676	5
	$C_{15}H_{22}$	202,1716	202,1809	9
	$C_{14}H_{19}$	187,1482	187,1530	14
	$C_{12}H_{15}$	159,1170	159,1217	17

Tab.6 Hochauflösung der Fragment-Ionen im MS von TG-4



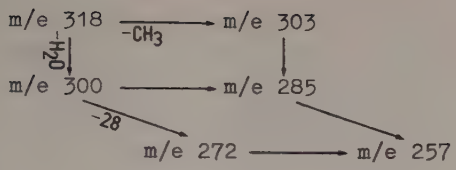
Weg ① (s.Abb.15) ⟶ m/e 135, m/e 107
Weg ② ⟶ m/e 189, m/e 161
Weg ③ ⟶ m/e 190, m/e 175, m/e 147
Weg ④ ⟶ m/e 203, m/e 175
Weg ⑤ ⟶ m/e 202, m/e 187, m/e 159

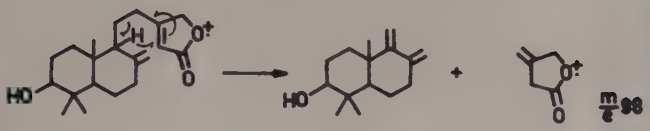
Abb.16 Wichtige Fragmentierungswege im MS von TG-4 Ac_3



Weg ① (s.Abb.15) ⟶ m/e 135, m/e 107
Weg ② ⟶ m/e 303, m/e 189, m/e 161
Weg ③ ⟶ m/e 175, m/e 147
Weg ④ ⟶ m/e 317, m/e 203, m/e 175
Weg ⑤ ⟶ m/e 316, m/e 187, m/e 159

Abb.17 Wichtige Fragmentierungswege im MS von TG-4 TFAc





Weg ① (s.Abb.15) ⟶ m/e 153, m/e 135, m/e 107
Weg ② ⟶ m/e 207, m/e 189, m/e 161
Weg ③ ⟶ m/e 175, m/e 147
Weg ④ ⟶ m/e 221, m/e 203, m/e 175
Weg ⑤ ⟶ m/e 187, m/e 159

Abb.19 Wichtige Fragmentierungswege im MS von TG-4 OxII

Zuordnung	Summenformel	ber. Masse	gef. Masse	%
M^+	$C_{20}H_{28}O_2$	300,2082	300,2046	26
M^+-CH_3	$C_{19}H_{25}O_2$	285,1848	285,1963	2
M^+-H_2O	$C_{20}H_{26}O$	282,1977	282,9816	3
Weg ①	$C_{10}H_{13}$	133,1014	133,1085	5
	C_9H_{15}	123,1170	123,1188	6
Weg ②	$C_{10}H_{13}O$	149,0963	149,1048	5
Weg ③	C_5H_5O	81,0339	81,0295	11
Weg ④	C_5H_6O	82,0417	81,8913	26
Weg ⑤	$C_{15}H_{23}O$	219,1743	219,1709	16
Weg ⑥	$C_{14}H_{21}O$	205,1587	205,1513	3
Weg ⑨	C_8H_{11}	107,0858	107,0917	12
Weg ⑩	$C_8H_{11}O$	123,0807	123,0848	5

Tab.7 Hochauflösung einiger Fragment-Ionen im MS von TG-4 OxI

m/e 300 (302)
m/e 151 (153)
m/e 133 (135)
m/e 123 (125)
m/e 149 (149)
m/e 81 (81)
m/e 82 (82)
m/e 219 (221)
m/e 191 (193)
-H2O
-CO
-CO

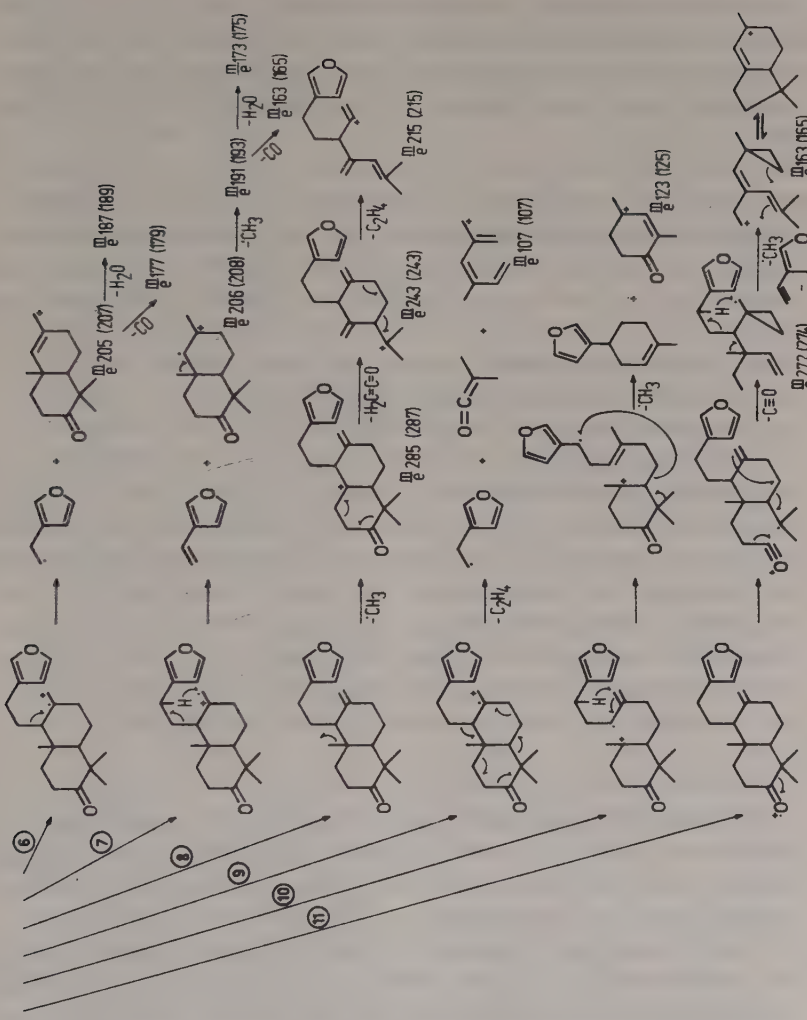


Abb.18 Wichtige Fragmentierungswege in den MS von TG-4 Ox I und (TG-4 Ox I-d_2)

ton der trisubstituierten Doppelbindung (δ = 5,9 ppm) korreliert werden: Beim Einstrahlen der jeweils anderen Frequenz vereinfachten sich beide Signale zu Singuletts. Damit lassen sich zwei allylische primäre Hydroxygruppen in der Seitenkette formulieren.

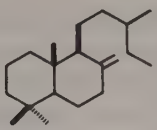
Die Z-Konfiguration der Seitenkette konnte zusätzlich durch Oxidation mit aktivem Mangan(IV)-oxid in Essigester bewiesen werden. Bei dieser sehr milden Oxidationsmethode werden ausschließlich allylständige primäre OH-Gruppen umgesetzt (ATTENBURROW et al. 1952). Das Hauptoxidationsprodukt (TG-4 Ox II) wies daher auch unverändert die sekundäre OH-Gruppe an C(3) auf: ein Triplett für das geminale Proton bei δ = 3,25 ppm. In der Seitenkette war dagegen ein Ringschluß entstanden. Aus den NMR-Signalen bei δ = 5,85 ppm (1H) und δ = 4,71 ppm (2H) mit Kopplungskonstanten kleiner als 2 Hz konnte die Existenz eines α,β-ungesättigten γ-Lactons mit ß-Substitution abgeleitet werden (BHACCA u. WILLIAMS 1964, TSCHESCHE u. PLENIO 1973), für das auch der Basispeak des Massenspektrums bei m/e = 98 ein Schlüsselbruchstück darstellt (Abb.19). Der während der Oxidation spontan eingetretene Ringschluß war nur unter der Bedingung möglich, daß die beiden oxidierbaren Substituenten der olefinischen Bindung in cis-Stellung vorlagen.

Diese cis-Stellung der beiden Hydroxygruppen konnte noch durch ein weiteres Derivat bestätigt werden, das als Hauptprodukt nach der Oxidation mit Jones Reagenz in Aceton erhalten wurde (TG-4 Ox I). Ein positiver Ehrlich Test, die charakteristischen Banden im IR-Spektrum bei 3080 cm^{-1}, 1503 cm^{-1} und 872 cm^{-1} sowie die Schlüsselbruchstücke im Massenspektrum bei m/e = 81 und m/e = 82 (Abb.18) ermöglichen in eindeutiger Weise den Nachweis der Entstehung eines Furanringes. Seine Monosubstitution in ß-Stellung ergibt sich aus dem NMR-Spektrum, in dem die α-Protonen als breite Singuletts bei δ = 7,38 ppm

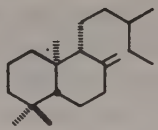
und δ = 7,22 ppm erscheinen, während das ß-Proton ein breites Singulett bei δ = 6,28 ppm bildet (GOPINATH et al. 1961). Auch kann die Länge der Seitenkette bestätigt werden durch das Auftreten des Massenpeaks m/e = 94, der einer Furyläthyl-Struktur entspricht (64 %). - Im Verlauf dieser Oxidation wurde die sekundäre Hydroxygruppe an C(3) zu dem schon oben erwähnten Keton (TG-4 Ox I) umgesetzt, wie aus NMR- und IR-Spektren eindeutig hervorgeht. Die starke IR-Bande bei 1710 cm^{-1} für ein 6-Ring-Keton liefert dabei nochmals einen Beweis für die angenommene Struktur des A-Rings.

Als Anhaltspunkt für einen auch chemischen Beweis für die Stellung der exocyclischen Doppelbindung, die zunächst nur aus rein biogenetischen Gesichtspunkten als an C(8) befindlich angenommen wurde (siehe dazu Literaturteil), kann die Summe der aliphatischen Protonen, mit Ausnahme der Methylsinguletts, in den NMR-Spektren dienen, die bis etwa 1 ppm aus der Integrationskurve entnommen und mit der Protonenanzahl im Bereich der chemischen Verschiebung von Allylprotonen - also etwa zwischen δ = 2 ppm und δ = 3 ppm - verglichen wurde. Diese Protonen bilden ein Verhältnis von 10:4, das nach der Mangan(IV)-oxid-Oxidation bestehen bleibt und nach der Chrom(VI)-oxid-Oxidation zugunsten der Protonen bei tieferem Feld auf den Wert 8:6 verändert wird. Dieser Effekt ist auf die ausschließlich bei der zweiten Oxidation (TG-4 Ox I) stattfindenden Einführung einer Ketogruppe in Ring A und der damit verbundenen Änderung der chemischen Verschiebung der beiden vicinalen Protonen an C(2) zurückzuführen. Die übrigen vier Protonen sind den zu der Doppelbindung allylständigen Protonen zuzuordnen. Die Anzahl dieser Protonen wäre dagegen um zwei größer, wenn die exocyclische Doppelbindung an C(7) lokalisiert wäre. Bei der ebenfalls noch denkbaren Stellung an C(6) ist - wie auch für den vorgenannten Fall - eine plausible Erklärung des Basispeaks bei m/e = 135 im Massenspektrum von TG-4 nicht möglich.

Schließlich war noch die Stereochemie des ermittelten Labdan-Gerüstes von TG-4 zu klären. Wie im Literaturteil näher beschrieben, wurden Vertreter beider enantiomeren Reihen bereits aus Pflanzen isoliert. Beispiele für eine Labdan-Struktur (XVIIa) bilden Manool (ROWE u. SCHAFFER 1965), Agathis-Säure (CARMAN u. MARTY 1966) - siehe Abb.6 - oder Methyl-Sciadopat (SUMIMOTO et al. 1964) - Beispiele für ent-Labdane (XVIIb) Polyalthia-Säure (GOPINATH et al. 1961), Methyleperuat (XLVII) (HENRICK u. JEFFERIES 1965) oder Daniella-Säure (HAEUSER et al. 1961).



Labdan (XVIIa)



ent-Labdan (XVIIb)

Nachdem die äquatoriale Stellung der OH-Gruppe an C(3) von TG-4 - wie oben ausgeführt - hinreichend bewiesen war, mußte die Kenntnis über die absolute Konfiguration dieses Asymmetriezentrums ausreichen, um einen deutlichen Anhaltspunkt für das Vorliegen eines der beiden Stereoisomere zu erhalten. Dazu wurde nach der Methode von HOREAU (1961, 1962, 1964) der sekundäre Alkohol (TG-4) mit einem Überschuß von racemischem α-Phenylbuttersäureanhydrid in Pyridin umgesetzt, das zuvor nach der von FALK und SCHLÖGL (1965) beschriebenen Methode synthetisiert worden war (siehe Experimenteller Teil). Nach der Abtrennung des entstandenen Esters und der Hydrolyse des Reagenzüberschusses konnte die optische Drehung der nicht umgesetzten α-Phenylbuttersäure gemessen werden. Bei dieser kinetischen Racematspaltung kann aus einem positiven Drehwert der freigesetzten α-Phenylbuttersäure ein bevorzugter Ver-

brauch von R-α-Phenylbuttersäure bei der Veresterung hergeleitet und daraus auf eine R-Konfiguration des Carbinols geschlossen werden. Aus dem tatsächlich gemessenen Rechtsdrehwert errechnete sich eine optische Ausbeute von ≥ 7 %. Dieser verhältnismäßig kleine Wert hat wahrscheinlich seine Ursache in der nur geringen noch zur Verfügung stehenden Substanzmenge und der ebenfalls stattfindenden Veresterung der beiden primären Hydroxygruppen im Molekül. Die Größe der optischen Ausbeute beeinträchtigt jedoch nach HOREAU (1964) nicht grundsätzlich die Aussage des Ergebnisses. Somit kann für die Verbindung TG-4 die Struktur XLI eines ent-8(17),13Z-Labdadien-3ß,15,16-triols als sehr wahrscheinlich angenommen werden.

Ein Diterpen mit dieser Struktur ist in der Literatur bisher noch nicht auffindbar. Die Verbindung TG-4 hat den Namen Tectograndinol erhalten.

Tectograndinol (XLI)

IV EIGENE UNTERSUCHUNGEN - EXPERIMENTELLER TEIL

A Allgemeine Angaben

Pflanzenmaterial:
Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Pflanzenmaterial, die Laubblätter von Tectona grandis L. fil., wurde in den Jahren 1972 und 1974 in der Nähe von Calcutta (Indien) gesammelt und luftgetrocknet. Ein Belegexemplar befindet sich im Herbarium des Instituts für Pharmazeutische Biologie der Universität Freiburg im Breisgau.

Chromatographie:
Die Papierchromatogramme wurden auf Fließpapier MN214 (Macherey, Nagel & Co) entwickelt.

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden DC-Alufolien Kieselgel F_{254} (Merck) verwendet. Zur Detektion wurde, wenn nichts anderes angegeben ist, eine Vanillin/Schwefelsäure-Lösung (1%ig in konz. H_2SO_4) als Sprühreagenz eingesetzt. Eine optimale Farbausbildung trat nach etwa zweiminütigem Erhitzen im Trockenschrank auf 120 °C ein. Alle Rf-Werte wurden aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit mit dem Faktor 100 multipliziert und als hRf-Werte angegeben.

Zur präparativen Säulenchromatographie wurde Kieselgel einer Korngröße von 0,063 bis 0,2 mm (ICN), Aluminiumoxid W 200 neutral (ICN), Celite 545 (Johns-Manville) und Servachrom-XAD 7 (Serva) verwendet. Für die Gelfiltration wurde Sephadex G 10 und Sephadex LH 20 (Pharmacia Fine Chemicals) eingesetzt.

Die Konzentrations- und Verhältnisangaben bei Fließmitteln beziehen sich auf Volumina (v/v).

Die Gaschromatogramme wurden mit einem Hewlett Packard HP 5710 A Gaschromatographen aufgenommen und bei der GC/MS-Kopplung wurde mit einem Gerät Varian 1400 gearbeitet.

Spektroskopie

Die UV-Absorptionsspektren wurden mit einem Zeiss PM Q II Spektralphotometer aufgenommen. Die Messungen wurden mit Quarzküvetten durchgeführt von 1,0 cm Schichtdicke. Im Bereich unterhalb 210 nm wurde mit Stickstoffspülung gearbeitet.

Die IR-Spektren wurden mit einem Leitz Unicam SP 200 G Spektralphotometer aufgenommen. Zur Messung wurden KBr-Preßlinge hergestellt - entweder mit einer Konzentration von etwa 1 mg/150 mg oder 0,6 mg/90 mg (als Mikropreß). Alle Absorptionsbanden sind in cm^{-1} angegeben und ihre Intensitäten mit s = stark, m = mittelstark oder w = wenig intensiv bezeichnet.

Die NMR-Spektren[+)] wurden mit einem Varian XL-100 oder Varian A-60 Spektrometer aufgenommen mit Tetramethylsilan als interner Standard. Alle Angaben von ppm sind δ-Werte; dabei bedeuten s = Singulett, s^+ = breites Singulett, d = Dublett, t = Triplett und m = Multiplett.

Die Massenspektren wurden mit einem Varian MAT CH 7 Massenspektrographen mit einer Elektronenenergie von 70 eV aufgenommen. Die hochauflösenden Massenspektren[+)] wurden mit einem Varian MAT CH 5-DF, Spectrosystem MS 100 gemessen (Auflösung 10 000, 10 % rel. Tal).

[+)] Ich danke Herrn Dr. K. Roth, Institut für Organische Chemie, für die Aufnahme der $Eu(fod)_3$-Spektren und Herrn Dr. G. Holzmann, Institut für Organische Chemie, für die Aufnahme der hochaufgelösten Massenspektren.

Schmelzpunkte, optische Drehung und Elementaranalyse

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Kofler Heiztischmikroskop bestimmt.

Die optische Drehung wurde mit einem Perkin-Elmer Polarimeter 141 gemessen.

Die Elementaranalyse wurde im Mikroanalytischen Laboratorium Ilse Beetz, Kronach, durchgeführt.

B Spezielle Angaben

Isolierung der Verbindungen TG-1 bis TG-8

Insgesamt wurden 2 500 g des getrockneten und gemahlenen Blattmaterials mit 5 l reinem Äthanol und danach zweimal mit je 3,75 l eines Äthanol/Wasser-Gemisches (8:2) je 30 min lang unter Rückfluß gekocht. Die vereinigten Extrakte wurden auf etwa 750 ml im Vakuum eingeengt, anschließend mit 500 g Celite verrieben und im Vakuum über Kieselgel vollständig getrocknet. Danach wurde dieser an Celite gebundene Rohextrakt (1045 g) auf Celite-Säulen (5 zu je 50 g) durch erschöpfende Elution mit Hexan/Methylenchlorid 1:1 (je 1,5 l) in eine lipophile und anschließende Elution mit Methylenchlorid/Methanol 1:1 (je 3 l) in eine hydrophile Fraktion getrennt. Der nach dem Einengen des hydrophilen Eluates verbleibende klebrige Rückstand betrug 163 g. Er wurde in wenig Methanol angelöst, mit Celite verrieben und nach der vollständigen Trocknung im Vakuum über Kieselgel auf vier Trennsäulen gegeben, die mit jeweils 500 g Aluminiumoxid (neutral) beschickt waren. Jede Säule wurde mit etwa 5 l Wasser eluiert. Dabei fielen nach dem Verdampfen des Wassers insgesamt 67,6 g dunkelbrauner, zähflüssiger Extrakt an. Dieser wurde - wiederum erst nach Trocknung der Celite-Verreibung - in drei Portionen nacheinander auf einer XAD-7-Säule (300 g) aufgetrennt. Zunächst wurde mit reinem Wasser als Eluens gearbeitet, dem nach Durchlauf von je 300 ml 1 % Methanol zusätzlich zugesetzt wurde, so daß der Methanolgehalt im Verlauf der Trennung von 1 % auf 5 % anstieg. Abschließend wurde noch mit 20 und 50 %igem Methanol eluiert. Nach der dc-Prüfung bot sich eine Einteilung in drei Fraktionen an. Aus der hydrophilsten Fraktion schieden sich bereits beim Abdampfen des Lösungsmittels Kristalle der Verbindung TG-1 ab. Es wurden 435 mg (0,017 %) isoliert und als meso-Inosit identifiziert.

Die zweite und mit 28,4 g größte Fraktion enthielt ein Zuckergemisch. Ein Anteil des dunkelgelben klebrigen Lackes wurde dreimal über eine Sephadex G-10-Säule zur Reinigung gegeben. Dabei fielen 140 mg eines klaren farblosen Lackes an, in dem Glucose und Fructose chromatographisch nachgewiesen wurden (TG-2a und b). Die Fraktion wurde nicht quantitativ aufgearbeitet.

Die dritte Fraktion (insgesamt 13,3 g) wurde durch Gradientenelution mit Methylenchlorid/Methanol/Wasser (Anfangskonzentration 95:5:0,5; Endkonzentration 80:20:2) auf Kieselgel-Säulen (Substanzgemisch/Träger-Verhältnis 1:300) aufgetrennt. Die daraus resultierenden fünf Unterfraktionen wurden einzeln an Kieselgel-Säulen nacheinander in den Systemen Methylenchlorid/Methanol/Wasser 90:10:1 bzw. 80:20:2 und Butanol/Toluol/Wasser 3:2:5 (Oberphase) chromatographiert. Die Verbindung TG-3 fiel dabei zusammen mit einem sich rotviolett anfärbenden Fleck mit nur wenig niedrigerem Rf-Wert und mehreren sich braun anfärbenden Flecken in der Unterfraktion 2 an. Durch Verteilungschromatographie mit Butanol/Toluol/Wasser 3:2:5, wobei der Kieselgelträger vor der Äquilibrierung mit der Oberphase mit 5 % Unterphase angeschüttelt und zwei Stunden stehengelassen wurde, konnten in den Vorläufen von vier gleichartigen Trennungen insgesamt 107 mg der noch unreinen Verbindung TG-3 angereichert werden. Die anschließende Gelfiltration an Sephadex LH-20 mit Äthanol ergab 39 mg (0,0015 %) der dc-einheitlichen Verbindung.

Der nach dem Einengen des lipophilen Eluates verbleibende Rückstand betrug 105 g. Er wurde ebenfalls in wenig Methanol gelöst, an Celite gebunden und nach der Trocknung im Vakuum an Kieselgel-Säulen (5 zu je 600 g) chromatographiert. Durch Gradientenelution mit Methylenchlorid/Methanol/Wasser (Anfangskonzentration 98:2:0,2; Endkonzentration 80:20:2) konnte in

vier Fraktionen aufgetrennt werden. Aus dem klargelben Vorlauf (Fraktion I) wurden 685 mg der Verbindung TG-8 direkt durch Kristallisation erhalten. TG-8 wurde als ein Gemisch von geradkettigen Alkanen identifiziert, die in den Teakblättern in Konzentrationen von > 0,03 % vorliegen.

Die Fraktion II (11,5 g) bestand zum größten Teil aus Chlorophyll. Im System Kieselgel (600 g) /FM 6 (Toluol/Chloroform 6:4) wurden drei Chlorophyllanteile unterschiedlicher Polarität abgetrennt. Im Nachlauf befanden sich zwei weitere Verbindungen, TG-7 und TG-6, die nach einer zweiten Trennung im gleichen System dc-einheitlich waren. TG-7 kristallisierte aus Methanol und wurde als Lupenon identifiziert (isolierte Menge 513 mg = 0,02 %). Von der Verbindung TG-6, die als Lupeol identifiziert werden konnte, fielen dagegen nur 140 mg (0,006 %) amorph an.

Fraktion III (1,3 g) wurde insgesamt auf eine Kieselgel-Säule (200 g) aufgetragen. Im System Tetrachlorkohlenstoff/Chloroform/n-Propanol 50:50:3 konnten die meisten roten Farbstoffe abgetrennt werden, die die Verbindung TG-5 bei allen vorhergehenden Versuchen überlagert hatten. Die gute Kristallisationsfähigkeit aus Methanol wurde zur Reinigung der Verbindung ausgenutzt, die sich als Gemisch dreier Phytosterine herausstellte. Insgesamt wurden 380 mg (0,015 %) isoliert.

Die Abtrennung der relativ polaren Chlorophyllanteile der Fraktion IV (insgesamt 6,8 g) an Kieselgel oder acetyliertem Perlon hatte keinen Erfolg. Lediglich an Aluminiumoxid-Säulen (Trenngemisch/Träger-Verhältnis 1:150) konnte im System Methylenchlorid/Methanol/Wasser 95:5:0,5 eine befriedigende Trennung erreicht werden. Dabei befand sich die Verbindung TG-4 zwar in einer noch immer grün gefärbten Unterfraktion, ließ sich jetzt aber kristallisieren. Die Kristalle konnten

mit gekühltem Äther klargewaschen und durch dreimaliges Umkristallisieren gereinigt werden. Die insgesamt isolierte Menge dieser Verbindung, die nach der Strukturaufklärung die Bezeichnung Tectograndinol erhielt, betrug 310 mg (0,012 %).

Eigenschaften von meso-Inosit (TG-1)

Zusammensetzung: $C_6H_{12}O_6$
Mol.-Masse: 180 (MS)
Schmelzpunkt: 225 °C (farblose Prismen, die sich bei 210 °C in feine Nadeln umlagern)

PC: (hRf-Werte)
13,5 (Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1)
23 (Phenol, wassergesättigt)
13 (Aceton/Wasser 95:5)
PC: (Laufstrecke in cm)
3,1 (durchlaufende aufsteigende PC, 5 Tage in Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1)

Detektion:
1. mit Kaliumpermanganatlösung (1 %) gelbweiß auf violettem Papier
2. mit ammoniakalischer Silbernitratlösung (1 %ig $AgNO_3$/33 %ig NH_3 4:1) und Nachbehandlung mit 2n-KOH Braunfärbung

IR: (KBr)
3400-3200 s, 2920 m, 1650-1630 m, 1440 s, 1415 s, 1370 m, 1325 w, 1250 s, 1220 w, 1200 s, 1150 s, 1120 s, 1055 s, 1020 m, 1005 s, 935 s, 905 s, 740 m cm^{-1}
MS: m/e (% Basispeak) Ionenquellentemperatur 150 °C
181 (1), 163 (1,5), 144 (5), 102 (14), 91 (3), 89 (3), 74 (6), 73 (100), 72 (8), 71 (11), 61 (5), 60 (23), 45 (11), 43 (17), 42 (14)
Der Vergleich mit authentischem meso-Inosit (Merck) ergab:
1. keine Depression des Mischschmelzpunktes
2. Übereinstimmung von Rf-Werten und Farbreaktionen (PC)
3. Übereinstimmung aller Einzelheiten im IR-Spektrum (Abb.8)
4. Übereinstimmung der Fragment-Ionen im Massenspektrum

Eigenschaften des Zuckergemisches (TG-2)

PC: (Laufstrecken in cm)

7,5	(TG-2a)	(35 h absteigende PC in Butanol/Eisessig/
10,6	(TG-2b)	Wasser 4:1:1)
29,3	(TG-2a)	(20 h absteigende PC in Essigester/Pyri-
32,4	(TG-2b)	din/Wasser 40:11:6)

DC: (hRf-Werte)

29,3	(TG-2a)	(Essigester/Eisessig/Methanol/Wasser
29,5	(TG-2b)	60:15:15:10)

Detektion:

1. mit Anilin-Phthalat-Reagenz (0,93 g Anilin und 1,66 g o-Phthalsäure in 100 ml wassergesättigtem Butanol) Braunfärbung nach Erwärmung (15 min bei 110 °C)
2. mit ammoniakalischer Silbernitratlösung (1 %ig $AgNO_3$/33%ig NH_3 4:1) und Nachbehandlung mit 2n-KOH Braunfärbung
3. mit Thymol-Schwefelsäure-Reagenz (0,5 g Thymol in 95 ml C_2H_5OH und 5 ml H_2SO_4) und 5 min Erwärmung auf 120 °C rötliche Anfärbungen

Beim pc und dc-Vergleich des Substanzgemisches TG-2 mit authentischer Glucose und Fructose ergaben die Laufstrecken und Anfärbungen der Verbindung TG 2a Übereinstimmung mit denen von Glucose und die der Verbindung TG-2b mit denen von Fructose.

Eigenschaften der Verbindung TG-3

DC: (hRf-Werte)
25,9 (Butanol/Toluol/Wasser 3:2:5, Oberphase)
20,5 (Chloroform/Methanol 9:1)
17,1 (Methylenchlorid/Methanol/Wasser 90:10:1)

UV: (H_2O)
λ_{max} = 188 nm (ε = 16 600)

IR: (KBr)
3550 bis 3200 s, 3000 w, 2920 s, 2840 w, 1730 s, 1640 w, 1520 w, 1465 w, 1410 m, 1385 w, 1335 w, 1270 w, 1240 w, 1200 w, 1170 w, 1125 w, 1055 m, 890 w cm^{-1}

NMR: (D_2O)
5,78 m, 4,93 s, 3,90 t (J=7 Hz), 3,63 s, 2,60 m^+, 2,21 s ppm

MS: m/e (% Basispeak) Ionenquellentemperatur 170 °C
244 (1), 227 (0,5), 226 (1,5), 209 (1), 208 (2), 196 (17), 183 (8), 179 (7), 178 (8), 167 (18), 149 (29), 137 (18), 109 (12), 107 (27), 105 (17), 95 (27), 93 (38), 91 (35), 83 (100), 82 (41), 79 (56), 67 (46), 55 (57), 41 (58), 31 (71)

Acetylierung der Verbindung TG-3

10 mg der Verbindung TG-3 wurden nach der üblichen Methode acetyliert, indem sie in wenig Pyridin gelöst und nach Zusatz von 0,3 ml Acetanhydrid 24 h bei Zimmertemperatur vor Licht geschützt stehengelassen wurden. Am nächsten Tag wurde das Reaktionsgemisch über Eis gegossen und das entstandene Acetat TG-3 Ac mit Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherphasen wurden mit kleinen Mengen einer 0,1n-Salzsäure zur Entfernung von Pyridinresten gewaschen, anschließend mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert und nach dem Waschen mit Wasser über Natriumsulfat getrocknet. Der nach dem Verdampfen des Lösungsmittels verbleibende Rückstand wurde an einer Kieselgel-Säule im System Toluol/Aceton 8:2 chromatographiert und ergab 3 mg des dc-einheitlichen Acetats TG-3 Ac, das massenspektrometrisch untersucht wurde.

Eigenschaften der Verbindung TG-3 Ac

MS: m/e (% Basispeak) Ionenquellentemperatur 100 °C
331 (15), 311 (2), 289 (2,5), 273 (3), 271 (5), 259 (3), 252 (3), 251 (5), 239 (3), 229 (4), 211 (7), 209 (7), 208 (7), 191 (7), 190 (6), 187 (3), 179 (12), 169 (42), 151 (5), 149 (15), 139 (9), 135 (9), 134 (11), 131 (7), 127 (10), 122 (13), 115 (8), 109 (24), 83 (10), 81 (16), 79 (18), 67 (12), 60 (10), 55 (13), 45 (16), 43 (100), 31 (2)

Hydrolyse der Verbindung TG-3

Für die saure Hydrolyse wurden 10 mg der Verbindung TG-3 in wenig Methanol gelöst und mit 4 ml 1n-Schwefelsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min am Rückflußkühler im siedenden Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde noch in der Wärme mit Bariumcarbonat neutralisiert und das gefällte Bariumsulfat über eine G 4 Fritte abgetrennt. Durch Ausschütteln mit Äther konnte das Aglykon vom Zuckeranteil getrennt werden. Die Ätherphasen wurden mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und nach Entfernung des Lösungsmittels dünnschichtchromatographisch untersucht. Die wäßrige Phase wurde ebenfalls eingeengt und papierchromatographisch mit authentischen Zuckern verglichen. Dabei wurde Rf-Gleichheit mit Glucose in drei verschiedenen Fließmittelsystemen festgestellt.

DC des Aglykons: (hRf-Werte)
50,6 (Chloroform/Methanol 9:1)
25,3 TG-3 zum Vergleich

DC des Zuckeranteils: (hRf-Werte)
29,2 (Essigester/Eisessig/Methanol/Wasser 60:15:15:10)

PC des Zuckeranteils: (Laufstrecken in cm)
5,8 (20 h absteigend in Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1)
29,0 (20 h absteigend in Essigester/Pyridin/Wasser 40:11:6)
40,0 (hRf-Wert in Phenol/Wasser 4:1)

Eigenschaften des Alkangemisches (TG-8)

Schmelzpunkt: 69 bis 70 °C (weiße Plättchen)

DC: (hRf-Werte)
73,5 (Tetrachlorkohlenstoff/Chloroform/n-Propanol 50:50:3)
72,5 (Toluol)
71,1 (Toluol/Chloroform 6:4)

IR: (KBr)
2950 m, 2910 s, 2840 s, 1460 m, 1450 m, 1365 w, 715 m, 705 m cm^{-1}

NMR: ($CDCl_3$)
0,9 s, 1,27 s ppm

MS: m/e (% Basispeak) Ionenquellentemperatur 155 °C
492 (3), 478 (0,5), 465 (3), 464 (10), 450 (1), 436 (2), 435 (4), 422 (2), 421 (5), 407 (7), 393 (7), 379 (8), 365 (8), 351 (8), 337 (9), 323 (9), 309 (10), 295 (10), 281 (11), 267 (12), 253 (13), 239 (14), 225 (16), 211 (18), 197 (19), 183 (20), 169 (25), 155 (27), 141 (31), 127 (39), 113 (47), 99 (50), 85 (81), 71 (100), 57 (92)

Die Auftrennung des Gemisches gelang durch kombinierte GC/MS (Abb.10 und Tab.3):
Stahlsäule, Länge 8 Fuß, Ø 1/8 Zoll; Träger Chromosorb G, AW-DMCS (Korn 60-80 mesh) belegt mit 1,5 % SE 30; Trägergas Helium, 30 ml/min, 3 atü; Temperatur 200 °C, 4 °C/min bis 250 °C.

Eigenschaften von Lupenon (TG-7)

Zusammensetzung: $C_{30}H_{48}O$
Mol.-Masse: 424 (MS)
Schmelzpunkt: 163 bis 166 °C (lange weiße Stäbchen)

DC: (hRf-Werte)
60,5 (Tetrachlorkohlenstoff/Chloroform/n-Propanol 50:50:3)
41,6 (Toluol/Chloroform 6:4)
25,2 (Toluol)

IR: (KBr)
3040 w, 2910 s, 2845 m, 2830 m, 1690 s, 1625 m, 1445 s, 1370 s, 1100 w, 875 s cm^{-1}

NMR: ($CDCl_3$)
4,70 s^+ (1H), 4,58 s^+ (1H), 2,45 m (2H), 1,71 s (3H), 1,47 bis 1,28 m, 1,09 s (6H), 1,04 s (3H), 0,98 s (3H), 0,96 s (3H), 0,82 s (3H) ppm

MS: m/e (% Basispeak) Ionenquellentemperatur 130 °C
425 (17), 424 (47), 409 (24), 381 (9), 368 (15), 355 (6), 342 (6), 341 (6), 314 (24), 313 (32), 245 (29), 232 (22), 218 (33), 205 (100), 189 (47), 149 (41), 147 (35), 135 (47), 133 (32), 123 (56), 121 (68), 109 (88), 107 (67), 95 (85), 93 (62), 81 (71), 69 (52), 67 (42), 55 (47)

Reduktion der Verbindung TG-7

60 mg der Verbindung TG-7 wurden in wenig Äthanol warm gelöst. Der klaren Lösung wurden sodann 120 mg Natriumborhydrid, in 80 %igem Äthanol gelöst, zugesetzt, was nach etwa 10 sec eine weiße Ausfällung verursachte. Die dc-Analyse zeigte, daß bereits nach 5 min Reaktionszeit eine vollständige Umsetzung von TG-7 stattgefunden hatte. Zur Zerstörung des Reagenzüberschusses wurde nun mit Eisessig bis pH 6 angesäuert. Der entstandene Alkohol konnte durch viermaliges Ausschütteln mit Chloroform abgetrennt werden. Die vereinigten Chloroformphasen wurden noch viermal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und anschließend mit Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel abgedampft und der Rückstand an einer Kieselgel-Säule im System Toluol/Chloroform 6:4 chromatographiert. Dabei konnten 26 mg der Verbindung TG-7 Red dc-einheitlich erhalten werden.

Von TG-7 Red wurden das IR-, NMR- und das Massenspektrum aufgenommen, um sie mit den entsprechenden Spektren von TG-6 zu vergleichen. Dabei konnte völlige Übereinstimmung aller Daten festgestellt werden.

Eigenschaften von Lupeol (TG-6)

Zusammensetzung: $C_{30}H_{50}O$
Mol.-Masse: 426 (MS)

DC: (hRf-Werte)
36,4 (Tetrachlorkohlenstoff/Chloroform/n-Propanol 50:50:3)
17,5 (Toluol/Chloroform 6:4)
8,8 (Toluol)

IR: (KBr)
3550 bis 3200 s, 3040 w, 2920 s, 2850 m, 2835 m, 1625 m, 1445 s, 1370 s, 1338 w, 1180 w, 1102 w, 1040 s, 1010 m, 980 m, 940 w, 880 s cm^{-1}

NMR: ($CDCl_3$)
4,70 s^+ (1H), 4,58 s^+ (1H), 3,20 m (1H, $W_{1/2}$=18 Hz), 1,69 s (3H), 1,60 bis 1,27 m, 1,04 s (3H), 0,97 s (3H), 0,95 s (3H), 0,84 s (3H), 0,80 s (3H), 0,77 s (3H) ppm

MS: m/e (% Basispeak) Ionenquellentemperatur 120 °C
426 (20), 412 (6), 411 (18), 408 (4), 393 (7), 383 (6), 370 (6), 344 (4), 317 (6), 316 (11), 315 (16), 299 (6), 297 (6), 272 (8), 257 (12), 247 (9), 234 (19), 229 (18), 218 (47), 207 (75), 203 (44), 189 (81), 135 (81), 123 (56), 121 (78), 109 (81), 107 (84), 95 (97), 93 (80), 81 (94), 69 (82), 55 (81)

Acetylierung der Verbindung TG-6

Die Acetylierung der Verbindung TG-6 mit Acetanhydrid wurde im Mikromaßstab durchgeführt. Dazu wurde etwa 1 mg TG-6 in einem Gemisch von Acetanhydrid und Pyridin 1:1 gelöst und 48 h bei Zimmertemperatur stehengelassen. In dieser Zeit ist die Acetylierung sämtlicher primärer und sekundärer Hydroxygruppen gewährleistet. Nach dem Abdampfen des Reagenzüberschusses unter vermindertem Druck wurde der Rückstand direkt im Massenspektrographen ionisiert. Das entstandene Acetat TG-6 Ac stellte sich als Monoacetat von TG-6 heraus.

Eigenschaften der Verbindung TG-6 Ac

Zusammensetzung: $C_{32}H_{52}O_2$
Mol.-Masse: 468 (MS)

MS: m/e (% Basispeak) Ionenquellentemperatur 150 °C
469 (9), 468 (20), 454 (3), 453 (8), 425 (2,5), 422 (1,5), 412 (3), 409 (5), 408 (7), 394 (3), 393 (7), 365 (3), 358 (4), 357 (6), 299 (5), 298 (5), 297 (6), 289 (6), 276 (8), 257 (8), 249 (13), 218 (52), 204 (27), 203 (36), 190 (32), 189 (71), 175 (26), 161 (26), 147 (30), 135 (48), 121 (48), 109 (45), 107 (48), 95 (56), 93 (46), 81 (49), 80 (43), 69 (48), 55 (36), 43 (100)

Oxidation der Verbindung TG-6

Für die Oxidation der Verbindung TG-6 wurden 20 mg in wenig Pyridin gelöst und mit Sarett-Reagenz versetzt. Dieser Chromoxid-Pyridin-Komplex war zuvor nach der Vorschrift in FIESER's Reagents (1967) durch sukzessive Zugabe von 1 g Chromsäureanhydrid zu 10 g Pyridin unter ständigem Rühren im kühlenden Wasserbad hergestellt. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei Zimmertemperatur gerührt und anschließend mit Äther extrahiert. Die Ätherphasen wurden nacheinander mit 0,1n-Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel abgedampft und das zurückbleibende Keton TG-6 Ox dc-analytisch mit TG-7 verglichen. Dabei konnte Identität von TG-6 Ox mit TG-7 festgestellt werden. Durch Vergleich der IR- und Massenspektren der beiden Verbindungen wurde das Ergebnis zusätzlich erhärtet.

Eigenschaften des Phytosteringemisches (TG-5)

Zusammensetzung: $C_{29}H_{50}O$, $C_{29}H_{48}O$, $C_{28}H_{48}O$ (10:6:1,3)
Mol.-Massen: 414, 412, 400 (MS)
Schmelzpunkt: 135 bis 138 °C (rechteckige Plättchen)

DC: (hRf-Werte)
10,8 (Toluol/Chloroform 6:4)
25,3 (Tetrachlorkohlenstoff/Chloroform/n-Propanol 50:50:3)
44,9 (Cyclohexan/Essigester 1:1)

IR: (KBr)
3550 bis 3200 s, 3030 w, 2960 s, 2930 s, 2870 s, 2850 s, 1730 w, 1640 w, 1465 m, 1445 w, 1380 m, 1365 w, 1060 m, 1020 w, 970 w, 960 w, 840 w, 800 w cm^{-1}

MS: m/e (% Basispeak) Ionenquellentemperatur 100 °C
415 (23), 414 (69), 413 (11), 412 (32), 400 (16), 399 (31), 397 (19), 396 (43), 394 (5), 382 (15), 381 (32), 379 (7), 369 (9), 367 (8), 354 (8), 351 (13), 329 (42), 327 (5), 315 (9), 314 (10), 303 (43), 301 (10), 300 (16), 289 (10), 275 (14), 273 (38), 272 (15), 271 (28), 261 (5), 256 (16), 255 (68), 253 (10), 246 (9), 241 (13), 231 (40), 229 (30), 215 (26), 213 (68), 199 (31), 187 (27), 185 (26), 173 (39), 161 (61), 159 (77), 147 (63), 145 (91), 133 (76), 107 (98), 105 (85), 95 (96), 83 (69), 81 (98), 69 (76), 55 (100), 43 (93)

GC: (Retentionszeiten in min)
16,9 ß-Sitosterin (TG-5a)
14,4 Stigmasterin (TG-5b)
13,2 Campesterin (TG-5c)
Stahlsäule, Länge 5 Fuß, Ø 1/8 Zoll; Träger Chromosorb WAW-DMCS (Korn 60-80 mesh) belegt mit 1,5 % SE 30; Trägergas Stickstoff, 30 ml/min, 3 atü; Temperatur 220 °C

Die Retentionszeiten sind identisch mit denen von authentischem Material. Bei Mischung von TG-5 mit den Referenzsubstanzen ß-Sitosterin, Stigmasterin und Campesterin entstehen keine zusätzlichen Peaks.

Acetylierung des Gemisches TG-5

2 mg des Substanzgemisches TG-5 wurden in einer Mischung von Acetanhydrid mit Pyridin 1:1 gelöst und zwei Stunden lang auf dem Wasserbad bei 60 °C erwärmt. Im Anschluß daran wurde der Reagenzüberschuß vorsichtig abgedampft und die zurückbleibende Substanz TG-5 Ac im Massenspektrographen ionisiert.

Eigenschaften des Gemisches TG-5 Ac

Zusammensetzung:	$C_{31}H_{52}O_2$,	$C_{31}H_{50}O_2$,	$C_{30}H_{50}O_2$	
Mol.-Massen:	456,	454,	442	(MS)

MS: m/e (% Basispeak) Ionenquellentemperatur 70 °C
456 (4), 397 (28), 396 (83), 395 (17), 394 (44), 383 (5), 382 (14), 381 (11), 380 (2), 379 (3), 368 (2), 367 (3), 354 (3), 351 (5), 288 (12), 275 (10), 273 (4), 261 (3), 256 (8), 255 (25), 253 (6), 229 (4), 228 (7), 213 (13), 181 (8), 159 (17), 149 (15), 147 (33), 145 (27), 111 (33), 109 (35), 107 (24), 105 (24), 97 (44), 95 (47), 93 (41), 83 (50), 81 (72), 69 (63), 57 (67), 55 (66), 43 (100)

Trimethylsilylierung des Gemisches TG-5

Für die Ätherbildung nach der von RINGSDORF (1973) beschriebenen Methode wurden 10 mg des Substanzgemisches TG-5 eingesetzt. Die Probe wurde mit 0,3 ml Hexamethyldisilazan, 0,1 ml Chlortrimethylsilan und 1 ml Pyridin versetzt und unter Stickstoff im geschlossenen Gefäß drei Stunden lang bei 60 °C aufbewahrt. Danach konnte das entstandene Ammoniumchlorid abzentrifugiert und die überstehende Lösung vorsichtig abgedampft werden. Der Rückstand enthielt die silylierten Verbindungen TG-5 TMS und wurde der massenspektrometrischen Untersuchung zugeführt.

Eigenschaften des Gemisches TG-5 TMS

Zusammensetzung:	$C_{32}H_{58}OSi$,	$C_{32}H_{56}OSi$,	$C_{31}H_{56}OSi$	
Mol.-Massen:	486,	484,	472	(MS)

MS: m/e (% Basispeak) Ionenquellentemperatur 150 °C
487 (32), 486 (78), 485 (16), 484 (38), 472 (14), 471 (17), 469 (7), 457 (3), 397 (33), 396 (100), 395 (13), 394 (27), 382 (19), 381 (34), 379 (9), 367 (6), 358 (24), 357 (78), 356 (24), 355 (15), 354 (9), 351 (10), 343 (13), 329 (7), 303 (7), 275 (12), 273 (4), 261 (4), 255 (35), 229 (6), 228 (5), 227 (5), 217 (8), 215 (13), 213 (14), 173 (15), 161 (17), 159 (24), 145 (27), 133 (23), 129 (73), 121 (24), 119 (27), 107 (26), 105 (21), 95 (28), 83 (31), 81 (29), 73 (42), 57 (32), 55 (31), 43 (40)

Eigenschaften von Tectograndinol (TG-4)

Zusammensetzung: $C_{20}H_{34}O_3$
ber.: C 74,49 H 10,63
gef.: C 74,26 H 10,86
Mol.-Masse: 322,2299 (ber.: 322,2499; MS)
Schmelzpunkt: 169 bis 171 °C (farblose Quader)
optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -32°$ (c = 0,2; $CHCl_3$)

DC: (hRf-Werte)
60,6 (Butanol/Toluol/Wasser 3:2:5, Oberphase)
26,9 (Methylenchlorid/Methanol/Wasser 90:10:1)
16,6 (Toluol/Aceton 6:4)

UV: (CH_3OH)
λ_{max} = 202,5 nm (ε = 14 000)

IR: (KBr)
3330 s, 3095 w, 3010 w, 2980 m, 2950 m, 2930 m, 2890 w, 2840 m, 1672 m, 1655 m, 1470 m, 1450 s, 1390 m, 1370 m, 1335 w, 1300 w, 1190 m, 1145 w, 1095 m, 1050 s, 1010 s, 970 m, 940 w, 887 s, 862 w cm^{-1}

NMR: (Pyridin-d_5)
5,9 t (1H, J=6 Hz), 5,7 s^+, 4,93 s^+ (1H), 4,77 s^+ (1H), 4,58 d (2H, J=6 Hz), 4,52 s (2H), 3,40 m (1H, $W_{1/2}$=18 Hz), 2,8 bis 1,95 (4H), 1,9 bis 1,2 (10 H), 1,14 s (3H), 0,96 s (3H), 0,73 s (3H) ppm
NMR: ($CDCl_3$)
5,62 m (1H), 4,9 s^+ (1H), 4,61 s^+ (1H), 4,22 m (4H), 3,29 m (1H), 1,85 m^+, 1,01 s (3H), 0,79 s (3H), 0,71 s (3H) ppm

MS: m/e (% Basispeak) Ionenquellentemperatur 150 °C
322 (1,5), 307 (4), 305 (4), 304 (17), 302 (2), 291 (7), 289

(25), 286 (12), 274 (7), 273 (27), 272 (6), 271 (25), 255 (13), 253 (7), 245 (5), 243 (4), 227 (6), 221 (3), 220 (7), 208 (4), 207 (9), 205 (5), 203 (12), 202 (9), 193 (3), 190 (11), 189 (9), 187 (12), 175 (17), 173 (10), 161 (14), 159 (15), 153 (10), 152 (14), 147 (21), 139 (14), 136 (18), 135 (100), 134 (17), 133 (30), 123 (18), 121 (30), 120 (15), 119 (30), 109 (27), 107 (49), 105 (28), 95 (28), 93 (39), 91 (22), 81 (36), 79 (24), 69 (21), 67 (20), 55 (24), 43 (14), 41 (14)

Acetylierung der Verbindung TG-4

Zur Acetylierung wurden 100 mg der Verbindung TG-4 in 0,5 ml Pyridin gelöst und mit 1 ml Acetanhydrid versetzt. Nach einer Stunde Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurden 3 ml Methanol hinzugefügt und das Gemisch wiederum 20 min stehengelassen. Anschließend wurde die Lösung im Vakuum eingeengt und der Rückstand dünnschichtchromatographisch untersucht. Weil kein einheitliches Reaktionsprodukt entstanden war, mußte das Gemisch an einer Kieselgel-Säule (im System Toluol/Aceton 85:15) aufgetrennt werden. Dabei konnten 38 mg des Hauptproduktes TG-4 Ac_3 und 8 mg des Nebenproduktes TG-4 Ac_2 erhalten werden.

Eigenschaften der Verbindung TG-4 Ac_2

Zusammensetzung: $C_{24}H_{38}O_5$
Mol.-Masse: 406 (MS)

DC: (hRf-Wert)
42,3 (Toluol/Aceton 75:25)

MS: m/e (% Basispeak) Ionenquellentemperatur 150 °C
406 (0,5), 391 (2), 388 (2), 373 (2), 346 (7), 331 (6), 328 (5), 313 (5), 286 (23), 274 (7), 273 (21), 271 (8), 268 (6), 255 (7), 253 (10), 245 (4), 227 (4), 225 (4), 203 (10), 187 (10), 177 (8), 175 (10), 173 (9), 161 (9), 159 (12), 152 (8), 149 (8), 147 (15), 146 (10), 145 (10), 139 (10), 135 (64), 134 (19), 133 (25), 121 (21), 119 (25), 109 (24), 107 (38), 105 (24), 95 (28), 93 (40), 91 (29), 81 (42), 79 (30), 69 (33), 67 (29), 55 (37), 43 (100)

Eigenschaften der Verbindung TG-4 Ac_3

Zusammensetzung: $C_{26}H_{40}O_6$
Mol.-Masse: 448 (MS)

DC: (hRf-Wert)
57,7 (Toluol/Aceton 75:25)

IR: (KBr)
3550 bis 3200 s, 3080 w, 2950 s, 2880 m, 2860 m, 1738 s, 1640 m, 1505 w, 1470 m, 1440 m, 1365 s, 1242 s, 1135 w, 1075 w, 1025 s, 980 w, 965 w, 885 m cm^{-1}

NMR: (Pyridin-d_5)
5,73 t (1H, J=6 Hz), 4,98 bis 4,58 m^+ (7H), 2,3 m, 2,05 s (3H), 2,03 s (3H), 2,00 s (3H), 1,58 m^+, 0,87 s (6H), 0,67 s (3H) ppm

MS: m/e (% Basispeak) Ionenquellentemperatur 125 °C
448 (0,2), 433 (0,2), 420 (0,3), 389 (4), 388 (8), 373 (5), 360 (2), 348 (4), 346 (3), 345 (4), 329 (8), 328 (25), 316 (7), 315 (27), 314 (4), 313 (11), 300 (3), 285 (5), 269 (6), 268 (12), 255 (12), 253 (15), 240 (3), 227 (6), 225 (6), 203 (11), 202 (9), 190 (8), 189 (7), 187 (11), 175 (13), 173 (11), 161 (9), 159 (13), 147 (16), 135 (70), 134 (27), 133 (32), 121 (23), 119 (27), 109 (27), 107 (36), 105 (24), 95 (24), 93 (37), 91 (22), 81 (31), 79 (23), 69 (24), 67 (17), 55 (22), 43 (100)

Umsetzung der Verbindung TG-4 mit Trifluoracetanhydrid

2 mg der Verbindung TG-4 wurden nach der von SCHUCHMANN (1974) beschriebenen Mikromethode umgesetzt. Dazu wurde die Substanz in wenig Pyridin gelöst, mit 0,05 ml Trifluoressigsäureanhydrid versetzt und eine Stunde lang bei 40 °C unter Luftabschluß erhitzt. Danach konnte der Reagenzüberschuß mit dem Lösungsmittel unter Erwärmen im Stickstoffstrom abgedampft werden. Aus dem Rückstand, der das entstandene Tris-trifluoracetat TG-4 TFAc enthielt, wurde eine Probe direkt im Massenspektrographen ionisiert.

Eigenschaften der Verbindung TG-4 TFAc

Zusammensetzung: $C_{26}H_{31}O_6F_9$
Mol.-Masse: 610 (MS)

MS: m/e (% Basispeak) Ionenquellentemperatur 35 °C
610 (1,5), 595 (2,5), 497 (4), 496 (5), 481 (5), 468 (0,1), 453 (2,5), 383 (2,5), 382 (4), 369 (3), 367 (3), 317 (5), 316 (8), 303 (4), 255 (3), 253 (1), 203 (21), 189 (6), 187 (8), 175 (8), 161 (11), 159 (9), 147 (15), 135 (50), 133 (18), 119 (22), 109 (22), 107 (29), 105 (20), 95 (25), 93 (27), 91 (20), 83 (21), 81 (56), 79 (20), 71 (24), 69 (40), 59 (34), 57 (35), 55 (34), 43 (100), 41 (29)

Oxidation der Verbindung TG-4 mit Jones Reagenz

Zur Oxidation von TG-4 wurden 100 mg der Verbindung in 9 ml Aceton, das zuvor durch Destillation über Kaliumpermanganat gereinigt worden war, unter Erwärmen gelöst. Anschließend wurde aus einer Mikrobürette solange tropfenweise Jones Reagenz (BOWERS, HALSAL u. JONES 1953) zugegeben (insgesamt 0,48 ml) bis der anfangs gelbgrüne Niederschlag eine beständige orangebraune Farbe angenommen hatte. Nach einstündigem Stehenlassen bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch in 30 ml Wasser gegossen und die Oxidationsprodukte mit Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherphasen wurden nacheinander mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Einengen im Vakuum konnte der Rückstand an einer Kieselgel-Säule mit Chloroform als Eluens chromatographiert werden. Dabei fielen 32 mg des Hauptproduktes TG-4 Ox I dc-einheitlich an. Von dem farblosen Lack wurde das UV-, IR-, NMR- und das Massenspektrum aufgenommen.

Eigenschaften der Verbindung TG-4 Ox I

Zusammensetzung: $C_{20}H_{28}O_2$
Mol.-Masse: 300,2046 (ber.: 300,2082; MS)

DC: (hRf-Werte)
32,4 (Chloroform)
69,9 (Methylenchlorid/Methanol/Wasser 95:5:0,5)

UV: (Äthanol)
λ_{max} = 201,5 nm (ε = 7 250), Schulter bei λ = 220 nm

IR: (KBr)
3080 w, 2940 s, 2870 s, 1710 s, 1645 m, 1503 m, 1455 m, 1385 m, 1365 w, 1265 m, 1195 w, 1168 m, 1140 w, 1110 w, 1065 m, 1027 m, 970 w, 892 m, 872 m, 780 m, 725 w cm^{-1}

NMR: ($CDCl_3$)
7,38 s^+ (1H), 7,22 s^+ (1H), 6,28 s^+ (1H), 4,99 s^+ (1H), 4,69 s^+ (1H), 2,8 bis 1,9 (6H), 1,9 bis 1,2 (8H), 1,1 s (3H), 1,03 s (3H), 0,88 s (3H) ppm

MS: m/e (% Basispeak) Ionenquellentemperatur 120 °C
300 (57), 286 (3), 285 (8), 282 (3), 272 (2), 271 (3), 267 (3), 257 (5), 243 (3), 239 (3), 229 (3), 219 (8), 215 (5), 206 (5), 205 (5), 203 (5), 201 (6), 191 (8), 187 (5), 177 (6), 175 (8), 173 (6), 163 (14), 151 (6), 149 (30), 148 (22), 147 (19), 135 (20), 133 (27), 123 (38), 121 (25), 109 (25), 107 (38), 105 (25), 95 (32), 94 (64), 93 (32), 91 (35), 82 (92), 81 (100), 79 (33), 69 (27), 67 (35), 55 (38), 53 (33), 41 (44)

Deuterierung der Verbindung TG-4 Ox I

Nach der bei BIEMANN (1962) angegebenen Methode wurden 10 mg der Verbindung TG-4 Ox I in wenig Deuteromethanol und schwerem Wasser gelöst. Zu der Lösung wurden einige Tropfen Deuteronatronlauge gegeben und die Mischung umgeschüttelt. Nach vorsichtigem Abdampfen des Alkohols im Vakuum, konnte das deuterierte Oxidationsprodukt TG-4 Ox I-d_2 mit Aceton ausgeschüttelt werden. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels blieb ein farbloser Lack zurück, der direkt der massenspektrometrischen Untersuchung zugeführt wurde.

Eigenschaften der Verbindung TG-4 Ox I-d_2

Zusammensetzung: $C_{20}H_{26}D_2O_2$
Mol.-Masse: 302 (MS)

MS: m/e (% Basispeak) Ionenquellentemperatur 120 °C
302 (59), 301 (8), 287 (9), 284 (3), 274 (1), 273 (3), 269 (3), 259 (5), 245 (3), 243 (3), 241 (3), 231 (3), 221 (9), 215 (6), 208 (7), 207 (8), 205 (8), 203 (8), 193 (12), 191 (6), 189 (6), 179 (6), 177 (8), 175 (9), 173 (8), 165 (14), 163 (11), 162 (11), 161 (12), 153 (8), 149 (26), 148 (24), 147 (21), 135 (18), 133 (26), 125 (38), 121 (25), 109 (29), 107 (35), 105 (23), 95 (41), 94 (67), 93 (29), 91 (31), 83 (35), 82 (96), 81 (100), 79 (29), 69 (42), 67 (32), 57 (35), 55 (41), 53 (33), 43 (36), 41 (52)

Oxidation der Verbindung TG-4 mit Mangan(IV)-oxid

20 mg der Verbindung TG-4 wurden in 2 ml Essigester gelöst und mit 20 mg aktivem Mangan(IV)-oxid (Merck) versetzt. Wie bei ATTENBURROW (1952) beschrieben, wurde die Suspension 30 min lang bei Raumtemperatur gerührt und anschließend die festen Bestandteile abfiltriert. Nachdem das Filtrat im Vakuum eingeengt war, mußte der Rückstand an einer Kieselgel-Säule (im System Methylenchlorid/Methanol/Wasser 95:5:0,5) chromatographiert werden, weil er aus mehreren Verbindungen bestand. Vom Hauptprodukt TG-4 Ox II konnten dabei 7 mg dc-einheitlich als farbloser Lack erhalten werden.

Eigenschaften der Verbindung TG-4 Ox II

Zusammensetzung: $C_{20}H_{30}O_3$
Mol.-Masse: 318 (MS)

DC: (hRf-Werte)
47,8 (Methylenchlorid/Methanol/Wasser 95:5:0,5)
64,9 (Methylenchlorid/Methanol/Wasser 90:10:1)

UV: (Acetonitril)
λ_{max} = 224,5 nm (ε = 4 300)

NMR: ($CDCl_3$)
5,85 m (1H), 4,90 s^+ (1H), 4,71 m (2H), 4,48 s^+ (1H), 3,25 m (1H), 2,8 bis 1,9 (4H), 1,9 bis 1,2 (10 H), 0,98 s (3H), 0,76 s (3H), 0,69 s (3H) ppm

MS: m/e (% Basispeak) Ionenquellentemperatur 150 °C
318 (2), 303 (2), 300 (10), 285 (11), 272 (2), 257 (8), 246 (5), 244 (4), 221 (4), 207 (2), 203 (15), 189 (5), 187 (5), 175 (9), 161 (5), 159 (5), 153 (7), 147 (10), 139 (12), 136 (12), 135 (61), 134 (14), 133 (16), 123 (14), 121 (18), 119 (22), 111 (13), 109 (19), 107 (32), 105 (21), 98 (100), 95 (21), 93 (32), 91 (33), 83 (11), 81 (40), 79 (32), 77 (20), 71 (18), 69 (29), 68 (13), 67 (36), 65 (10), 57 (16), 55 (44), 53 (25), 43 (49), 41 (67), 39 (18)

Synthese von racem. α-Phenylbuttersäureanhydrid (α-PBSA)

Das für die Konfigurationsbestimmung nach HOREAU (1961, 1962) benötigte racem. α-Phenylbuttersäureanhydrid (α-PBSA) wurde nach der von FALK und SCHLÖGL (1965) beschriebenen Methode aus racem. α-Phenylbuttersäure (α-PBS) hergestellt, indem das α-PBS-Natriumsalz mit dem α-PBS-Säurechlorid umgesetzt wurde.

Zur Bildung des α-PBS-Natriumsalz wurden 0,025 Mol α-PBS (4,1 g) in wenig Wasser gelöst und mit einer 0,025-molaren Natronlauge bis zum Neutralpunkt titriert. Nach Abdestillieren des Wassers fiel das entstandene Salz fest an. - Um das α-PBS-Säurechlorid zu bilden, wurden ebenfalls 0,025 Mol α-PBS eingesetzt. Sie wurden zusammen mit 0,038 Mol frisch destilliertem Thionylchlorid (4,5 g) drei Stunden lang am Rückflußkühler gekocht. Im Anschluß daran wurde überschüssiges Thionylchlorid im Wasserbad abdestilliert und der Rückstand mit dem zuvor gebildeten α-PBS-Natriumsalz versetzt. Dabei entstand eine Suspension, die 30 min bei 70 °C auf dem Wasserbad gerührt wurde. Nach dieser Zeit ließ sich das Anhydrid als hellgelbe ölige Phase von dem ausgefallenen Kochsalz abgießen und konnte durch Vakuumdestillation gereinigt werden. Von dem nun farblosen Öl (1,3 g) wurde das IR-, NMR- und das Massenspektrum aufgenommen, um die Einheitlichkeit der Verbindung (α-PBSA) zu überprüfen.

Eigenschaften der Verbindung α-PBSA

Zusammensetzung: $C_{20}H_{22}O_3$
Mol.-Masse: 310 (MS)
optische Drehung: ± 0

IR: (KBr)
3055 w, 3022 w, 2960 m, 2928 m, 2870 w, 1798 s, 1728 s, 1690 m, 1585 w, 1478 w, 1440 m, 1368 w, 1008 s, 930 m, 730 w, 685 s cm^{-1}

NMR: ($CDCl_3$)
7,18 m (10 H), 3,42 t (2H, J=12Hz), 1,98 m (4H), 0,82 t (6H, J=12Hz) ppm

MS: m/e (% Basispeak) Ionenquellentemperatur 155 °C
310 (0,1), 292 (0,2), 266 (0,2), 238 (0,2), 219 (0,3), 204 (0,2), 178 (0,5), 165 (4), 164 (26), 147 (3), 146 (6), 136 (4), 135 (3), 120 (8), 119 (56), 118 (7), 117 (9), 103 (7), 92 (10), 91 (100), 79 (10), 78 (8), 77 (13), 65 (7), 63 (5), 51 (8), 43 (12), 41 (10)

m* 91 nach 65 ber.: 46,43 gef.: 46,4
m* 119 nach 91 ber.: 69,59 gef.: 69,5
m* 147 nach 119 ber.: 96,33 gef.: 96,2

Bestimmung der absoluten Konfiguration von C(3) in TG-4 nach der Horeau-Methode

10^{-4} Mol der Verbindung TG-4 (32,2 mg) wurden mit einer Lösung von 6 x 10^{-4} Mol racem. α-Phenylbuttersäureanhydrid (186 mg) in Pyridin versetzt. Nach 15 h Stehen bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch mit Benzol und Wasser versetzt und im Scheidetrichter getrennt. Danach wurde die esterhaltige Benzolschicht zusätzlich mit 0,2n-Natriumcarbonat-Lösung ausgeschüttelt und die vereinigten wäßrigen Phasen noch einmal mit Benzol gewaschen, bevor mit verdünnter Salzsäure angesäuert wurde. Anschließend wurde erschöpfend mit Benzol ausgeschüttelt, die vereinigten Benzolphasen getrocknet und im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in Benzol zu 2 ml gelöst und die optische Drehung dieser Lösung in einer Mikroküvette (10 cm) gemessen. Der Meßwert betrug $\alpha_D^{22} = +0{,}055^\circ$ und entspricht einer optischen Ausbeute von $\geq$ 7 %. Das bedeutet R-Konfiguration des Carbinols.

V DISKUSSION

In der klassischen Pflanzensystematik (SCHAUER 1847, BRIQUET 1897 und MELCHIOR 1964) wird Tectona grandis L. fil. zur Unterfamilie Viticoideae innerhalb der Familie der Verbenaceae gezählt. In neueren Arbeiten ist die Gattung Tectona nicht erwähnt. Allgemein wird man aber davon ausgehen müssen, daß Tectona innerhalb der Viticoideae recht ursprüngliche morphologische Merkmale aufweist. Das geht vor allem aus dem noch radiären und mit Ausnahme des Gynoeceums nicht reduzierten Blütenbau hervor, sowie aus der Ausbildung terminaler Rispen, die erst in den Achsen 3. Ordnung dichasial auswachsen, und den noch vollständig kugelförmigen Früchten. Schon BRIQUET stellte daher die Gattung an den Anfang der Viticoideae in unmittelbare Nähe zu den Gattungen Callicarpa und Vitex. Dabei wird Callicarpa aufgrund der Ausbildung vielkerniger Steinfrüchte als noch primitiver angesehen, wohingegen Vitex durch die deutlich zygomorphe Blütenausbildung bereits eine höhere Progressionsstufe erreicht hat. Es ist daher nicht verwunderlich, wenn die Gattungen Callicarpa und Vitex auch in der neu aufgestellten Systematik EL-GAZZAR und WATSONs (1970) direkt nebeneinander stehen. Sie bilden dort zusammen mit den Gattungen Clerodendrum, Caryopteris, Aegiphila und Amasonia die Gruppe 782 (siehe dazu Tab.8).

Bei einem Vergleich der aus Tectona grandis L. fil. in der vorliegenden Arbeit isolierten sekundären Pflanzeninhaltsstoffe mit den aus der Literatur bekannten phytochemischen Untersuchungsergebnissen aus den Gattungen der Gruppe 782 (siehe dazu Tab.9 u. Abb.20), kann festgestellt werden, daß auch vom chemischen Standpunkt her, eine enge Verwandtschaft der Gattung Tectona zu den Gattungen Callicarpa und Vitex denkbar erscheint. Während wahrscheinlich von allen Vitex-

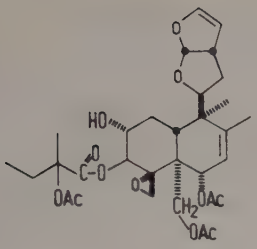
Tab.8 Systematik der Viticoideae

SCHAUER 1847	BRIQUET 1897	MELCHIOR 1964	EL-GAZZAR/WATSON 1970
Viticeae	Viticoideae	Viticoideae	Gruppe 779 aus A I 790
Pityrodia	Callicarpeae	Callicarpeae	Ajugoideae
Tectona	Tectoneae	Geunsia	Prasieae
Premna	Viticeae	Callicarpa	Stachydeae:
Petitia	Clerodendreae	Aegiphila	Melitteae
Callicarpa		Tectoneae	Viticoideae:
Aegiphila	Caryopteridoideae	Tectona	Premna
Volkameria		Viticeae	Holmskioldia
Clerodendrum		Premna	Gmelina
Cyclonema		Vitex	
Oxera		Cornutia	Gruppe 782 aus A I 790
Amasonia		Gmelina	Viticoideae
Gmelina		Clerodendreae	Clerodendrum
Cornutia		Clerodendrum	Caryopteris
Vitex		Holmskioldia	Aegiphila
Holmskioldia		Caryopteridoideae	Amasonia
Quoya		Teijsmanniodendreae	Callicarpa
Hemigymnia		Teijsmanniodendrum	Vitex
Scleroon		Caryopterideae	
		Caryopteris	
		Glossocarya	

	Iridoide	Diterpene		
	Vorkommen	Vorkommen	Strukturtypen	isolierte Verbindungen
Clerodendrum	+	+	Clerodan	XLIX, L, LI
Caryopteris	+	+	Clerodan	LI bis LVI
Callicarpa	-	+	Clerodan Kauran Abietan	LX LVII, LVIII LIX
Vitex	+	+	Labdan	LXI

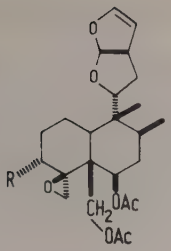
Tab.9 Überblick über Iridoid- und Diterpenvorkommen in den Gattungen der Gruppe 782

Arten Iridoide akkumuliert werden, haben offenbar die Gattungen Callicarpa und Tectona diese Fähigkeit noch nicht entwickelt oder bereits wieder verloren. Diterpene wurden dagegen in Vertretern beider Gattungen aufgefunden. Die bisher isolierten Verbindungen Callicarpon (LIX), Maingaya-Säure (LX) und Calliterpenon (LVII und LVIII) aus Callicarpa-Arten sowie das Prerotundifuran (LXI) aus Vitex rotundifolia stellen dabei verhältnismäßig einfache Diterpenstrukturen dar - wie auch das aus Tectona grandis L. fil. neu isolierte Tectograndinol (TG-4) (XLI). Sie alle unterscheiden sich deutlich von den komplizierten Clerodan-Derivaten der Gattungen Clerodendrum und Caryopteris, die ihrerseits eine auffällige strukturelle Übereinstimmung aufweisen: Alle besitzen eine Tetra- oder Perhydrofurofuran-Struktur in der Seitenkette und einen



= Clerodendrin A (XLIX)

7,8-Dihydro- = Clerodendrin B (L)



R = H = Clerodin (LI)

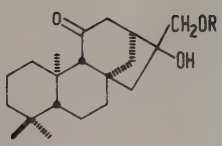
14,15-Dihydroclerodin (LII)

R = OH = Caryoptinol (LIII)

14,15-Dihydrocaryoptinol (LIV)

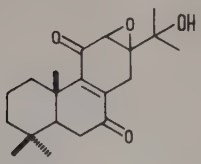
R = OAc = Caryoptin (LV)

14,15-Dihydrocaryoptin (LVI)

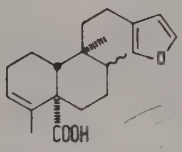


R = H = Calliterpenon (LVII)

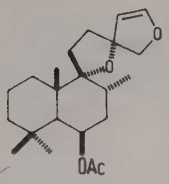
R = Ac = Calliterpenonmonoacetat (LVIII)



= Callicarpon (LIX)



= Maingaya-Säure (LX)



= Prerotundifuran (LXI)

Abb.20 Diterpene aus den Gattungen der Gruppe 782

Epoxidring an C(4) (XLIX bis LVI).

Aus diesen Überlegungen heraus erscheint es berechtigt, die Gattung Tectona zwischen die Gattungen Callicarpa und Vitex auch im System von EL-GAZZAR und WATSON (1970) einzuordnen. Diese chemotaxonomischen Rückschlüsse können allerdings nur als vorläufige Ergebnisse gewertet werden, da die Anzahl der bisher auf Iridoide und Diterpene hin untersuchten Pflanzenarten des Verwandtschaftskreises der Viticoideae noch als in keiner Weise repräsentativ gelten darf. Es kann hier lediglich festgestellt werden, daß die aus der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse nach dem heutigen Wissensstand mit der bestehenden systematischen Einordnung von Tectona grandis L. fil. in Einklang stehen. Der vorgefundene Chemismus in den Blättern von Tectona grandis L. fil. stimmt dabei gut mit den Sekundärstoff-Spektren anderer Viticoideae überein: So sind Zuckeralkohole, wie das meso-Inosit (TG-1),auch für Clerodendrum- und Vitex-Arten charakteristisch (HEGNAUER 1973), Triterpene vom Lupan-Typ, wie das Lupeol (TG-6) und Lupenon (TG-7), wurden unter anderem aus Clerodendrum infortunatum isoliert (MANZOOR-I-KHUDA 1965, 1966), Alkane (TG-8) konnten auch in Vitex- (Pentatriakontan von CAMBIE 1959) und Gmelina-Arten (Hentriakontan von RAO u. RAO 1970) nachgewiesen werden, während die Phytosterine (TG-5) und Zucker (TG-2) ubiquitär vorkommen. Der von SANDERMANN und SIMATUPANG (1966) aufgrund biogenetischer Untersuchungen an den von ihnen in großer Zahl isolierten Anthrachinonen und Naphthochinonen beobachtete "lebhafte isoprenoide Stoffwechsel" von Tectona grandis L. fil. hat sich damit bestätigt und durch die Isolierung von Di- und Triterpenen als noch umfangreicher herausgestellt.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Der Äthanolextrakt aus den Laubblättern von Tectona grandis L. fil. wurde durch Elution mit Hexan/Methylenchlorid (1:1) einerseits und Methylenchlorid/Methanol (1:1) andererseits in eine lipophile und in eine hydrophile Fraktion getrennt, die separat aufgearbeitet wurden.

Aus dem hydrophilen Extraktanteil konnte nach der Vorreinigung an Aluminiumoxid-Säulen durch phasenumgekehrte Adsorptionschromatographie neben einer glucose- und fructosehaltigen Zuckerfraktion (TG-2) meso-Inosit (TG-1) isoliert werden. Nach sorgfältiger präparativer Aufarbeitung der noch verbleibenden hydrophilen Bestandteile wurde festgestellt, daß typische Iridoidglykoside allenfalls in Spuren vorkommen.

Durch Aufarbeitung des lipophilen Extraktanteils gelang es mittels kombinierter Säulenchromatographie an Kieselgel und Aluminiumoxid eine Alkanfraktion (TG-8), die Triterpene Lupenon (TG-7) und Lupeol (TG-6), ein Gemisch der Phytosterine ß-Sitosterin, Stigmasterin und Campesterin (TG-5) sowie ein neues Diterpen (TG-4) zu isolieren.

Die Substanzen wurden durch spektroskopische und physikalisch-chemische Untersuchungen charakterisiert und durch Vergleich mit authentischem Material papierchromatographisch (TG-1 und TG-2) bzw. gaschromatographisch (TG-5 bis TG-8) identifiziert.

Das bisher nicht bekannte Diterpen (TG-4), das als Tectograndinol bezeichnet wurde, konnte in seiner Struktur und Stereochemie aufgeklärt werden. Aufgrund chemischer und spektroskopischer Untersuchungen wurde ihm die Struktur eines ent-8(17),13Z-Labdadien-3ß,15,16-triols zugeordnet.

Die Ergebnisse wurden im Hinblick auf eine eventuelle chemotaxonomische Verwertbarkeit sowie auf eine möglicherweise bestehende Korrelation des Auftretens von Iridoiden und Diterpenen innerhalb der Unterfamilie Viticoideae diskutiert.

VII LITERATURANGABEN

ACHILLADELIS, B. u. J.R. HANSON, Phytochemistry 7, 589 (1968)
– – , J. Chem. Soc. C, 2010 (1969)
AGARWAL, S.C., M.G. SARNGADHARAN u. T.R. SESHADRI, Tetr. Lett. 30, 2623 (1965)
ATTENBURROW, J. et al., J. Chem. Soc. I, 1094 (1952)
BARTON, D.H.R., J. Chem. Soc., 1029 (1953)
– , H.T. CHEUNG, A.D. CROSS, L.M. JACKMANN u. M. MARTIN-SMITH, J. Chem. Soc., 5061 (1961)
BENTHAM, in De Candolle, Prodromus XI (1847)
BHACCA, M.S. u. D.H. WILLIAMS, Appl. of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry, p. 45, Holden-Day, San Francisco (1964)
BIEMANN, K., Mass Spectrometry, Organic Chemical Applications, McGraw Hill, New York (1962)
BIRCH, A.J., R.W. RICKARDS, H. SMITH, A. HARRIS, W.B. WHALLEY, Tetrahedron 7, 241 (1959)
BOBBITT, J.M. u. K.P. SEGEBARTH in W.J. TAYLOR u. A.R. BATTERSBY, Cyclopentanoid Terpene Derivates, Marcel Dekker, Inc., New York (1969)
BOHLMANN, F. u. CH. ZDERO, Chem. Ber. 109, 1436 (1976)
BOWERS, A., T.G. HALSALL u. E.R.H. JONES, J. Chem. Soc., 2555 (1953)
BREITWIESER, K., Pharmakognostische Untersuchungen über Verbenaceae, Habilitationsschrift, Braunschweig (1942)
BRIQUET, J. in Engler & Prantl, Die Natürlichen Pflanzenfamilien IV, 3a, Leipzig (1897)
BUDZIKIEWICZ, H., C. DJERASSI u. D.H. WILLIAMS, Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry, Vol. II, Holden-Day, San Francisco (1964)
CAMBIE, R.C., New Zeal. J. Science 2, 230 (1959)
CARMAN, R.M. u. R.A. MARTY, Aust. J. Chem. 19, 2403 (1966)

CHATTERJEE, A., S.K. DESMUKH u. S. CHANDRASEKHARAN, Tetrahedron 28, 4319 (1972)
COFFEY, S. in Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, Vol. IIc, Elsevier Publishing Company (1969)
CROSS, B.E., Progress in Phytochem. I, 195 (1968)
DEVON, T.K. u. A.J. SCOTT, Handbook of Naturally Occurring Compounds, Bd. 2, Academic Press, New York, London (1972)
EL-GAZZAR, A. u. L. WATSON, New Phytol. 69, 451 (1970)
ENZELL, C.R. u. R. RYHAGE, Arkiv för Kemi 23, Nr. 33, 373 (1965)
FALK, H. u. K. SCHLÖGL, Monatsh. Chem. 96, 282 (1/1965)
FIESER, L. u. M. FIESER, Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons, New York (1967)
GOPINATH, K.W., T.R. GOVINDACHARI, P.C. PARTHASARATHY u. N. VISWANATHAN, Helv. Chim. Acta 44, (124), 1040 (1961)
HÄNSEL, R. u. E. WINDE, Archiv der Pharm. 293, 556 (1960)
–, CH. LEUKERT, H. RIMPLER u. K.D. SCHAAF, Phytochem. 4, 19 (1965)
HAEUSER, J., R. LOMBARD u. F. LEDERER, G. OURISSON, Tetrahedron 12, 205 (1961)
HAIS, I.M. u, K. MACEK, Handbuch der Papierchromatographie, Bd. 1, VEB Fischer Verlag, Jena (1958)
HANSON, J.R., Fortschr. der Chem. org. Naturst. 29, 395 (1971)
– , Progr. in Phytochem. III, 231 (1972)
HEGNAUER, R., Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. 6, Birkhäuser Verlag Basel u. Stuttgart (1973)
HENDERSON, M.S. u. McCRINDLE, J. Chem. Soc. C, 2014 (1969)
HENRICK, C.A. u. P.R. JEFFERIES, Tetrahedron 21, 1175 u. 3219 (1965)
HIROTSU, K. u. A. SHIMADA, Chem. Lett. 10, 1035 (1973)
HOREAU, A., Tetrahedron Lett. 15, 506 (1961)
– , Tetrahedron Lett. 21, 965 (1962)

HOREAU, A. u. H.K. KAGAN, Tetrahedron 20, 2431 (1964)
HOSOZAWA, S., N. KATO u. K. MUNAKA, Phytochem. 12, 1833 (1973)
– , – , – , Phytochem. 13, 1019 (1974)
HUGEL, G., L. LODS, J.M. MELLOR, D.W. THEOBALD u. G. OURISSON, Bull.Soc. Chim., 2882 (1965)
IRION, E., Dissertation, Berlin (1975)
JENSEN, S.R., B.J. NIELSEN u. R. DAHLGREN, Botan. Notiser, 128, 148 (1975)
JUNELL, S., Symb. Bot. Upsala 4, 1 (1934)
KAFUKU, K. u. K.SEBE, Bull. Chem. Soc. Japan 7, 114 (1932)
KATO, N., S. SHIBAYAMA u. K. MUNAKATA, Chem. Commun., 1632 (1971)
– , – , – , J. C. S. Perkin I, 712 (1972)
– , – , – , u. M. TAKAHASHI, Agr. Biol. Chem. 36, 2579 (1972)
– , K. MUNAKATA u. C. KATAYAMA, J. C. S. Perkin II, 69 (1973)
KAWAZU, K. u. T. MITSUI, Tetrahedron Lett. 30, 3519 (1966)
– , – , Agr. Biol. Chem. 31, 494 u. 498 (1967)
– , – , u. C. NISHINO, Tetrahedron Lett. 19, 1541 (1971)
– , – , – , Agr. Biol. Chem. 35, 1921 (1971)
KNIGHTS, B.A., J. Gas Chromatogr. 5, 273 (1967)
KOOIMAN, P., Acta Bot. Neerl. 24 (5-6), 459 (1975)
MANZOOR-I-KHUDA, M., Tetrahedron 21, 797 (1965)
– , Tetrahedron 22, 2377 (1966)
McMURRY, H.L. u. V. THORNTON, Anal. Chem. 24, 318 (1957)
MELCHIOR, H. in Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien, Bd. 2, 12. Aufl., Bornträger Verlag, Berlin (1964)
NAKANISHI, K., Infrared Absorption Spectroscopy, Holden-Day, San Francisco (1962)
NEUMANN, B., Dissertation, Berlin (1976)
OURISSON, G., 5-Nobel Sympos. 25, 129 (1973)
PAUL, J.C., G.A. SIM, T.A. HAMOR u. J.M. ROBERTSON, J. Chem. Soc., 4133 (1962)
PONSINET, G., G. OURISSON u. A.C. OEHLSCHLAGER, Recent Advances in Phytochem. Bd. 1, 271, New York (1968)

RAO, D.V. u. E.V. RAO, Ind. J. Pharm. 32, 140 (1970)
RIMPLER, H., Phytochem. 11, 2653 (1972)
– , Archiv der Pharm. 305, 746 (1972)
– , nach S.R. JENSEN, B.J. NIELSEN u. R. DAHLGREN, Botan. Notiser, 128, 148 (1975)
RINGSDORF, W., Kontakte (Merck) 3, Derivatisierungs-Methoden in der GC (1973)
ROMANIS, R., J. Chem. Soc. 51, 868 (1887)
ROWE, J.W. u. G.W. SHAFFER, Tetrahedron Lett. 30, 2633 (1965)
RUZICKA, L., Experientia 9, 357 (1953)
– , Proc. Chem. Soc., 341 (1959)
SANDERMANN, W. u. H.H. DIETRICHS, Holz als Roh- u. Werkst. 15, 281 (1957)
– , u. M.H. SIMATUPANG, Angew. Chemie 74, 782 (1962)
– , – , Chem. Ber. 96, 2182 (1963)
– , – , Tetrahedron Lett. 19, 1269 (1963)
– , – , Naturwissensch. 10, 262 (1965) u. 54, 118 (1967)
– , – , Holz als Roh- u. Werkst. 3, 190 (1966) u. 24,(1966)
SCHAUER, J.C. in De Candolle, Prodromus XI (1847)
SCHUCHMANN, H., Kontakte (Merck) 1, 20 (1974)
SPITELLER, G., Massenspektrometrische Strukturanalyse organ. Verbind., Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1966)
– , u. M. SPITELLER-FRIEDMANN, Organ. Chemie 12,(3), (1969)
SUMIMOTO, M., T. TANAKA u. K. MATSUFUJI, Tetrahedron 20, 1427 (1964)
TRIM, A.R. u. R. HILL, Biochem. J. 50, 310 (1952)
TSCHESCHE, R. u. H.U. PLENIO, Chem. Ber. 106, 2929 (1973)
WALLACH, O., Liebigs Ann. Chem. 227, 227 (1885)
WEINGES, K., P. KLOSS u. W.D. HENKELS, Liebigs Ann. Chem. 795, 173 (1972)
WENKERT, E., Chem. and Ind., 282 (1955)
WIECHERT, R. et al., Helv. Chim. Acta 49, Nr. 179, 1581 (1966)
WINDE, E., Dissertation, Berlin (1959)

VIII LEBENSLAUF

24. Januar 1949	in Hannover geboren als erstes Kind des Kaufmanns Hilmar Schmidt und seiner Ehefrau Marga, geb. Kleen
1955 bis 1959	Besuch der Volksschule am Altenbekener Damm, Hannover
1959 bis 1967	Besuch der Elsa-Brändström-Schule, Hannover
22. Mai 1967	Reifeprüfung im neusprachlichen Zweig
1967 bis 1969	Praktikantenzeit in der Aegidien-Apotheke, Hannover
18. September 1969	Pharmazeutische Vorprüfung in Hannover
1969 bis 1972	Pharmaziestudium an der Freien Universität Berlin
4. Oktober 1972	Pharmazeutische Prüfung in Berlin
27. Oktober 1972	Heirat mit dem Diplomingenieur Henning Christiansen
2. Januar 1973	Approbation als Apothekerin
1971 bis 1974	Tätigkeit als Studentische Hilfskraft am Institut für Pharmakognosie und Phytochemie
seit März 1973	Beschäftigung mit der vorliegenden Arbeit unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Rimpler
seit November 1974	Tätigkeit als Teilzeitassistentin am gleichen Institut

difo-druck · 8600 bamberg
untere königstraße 30